

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

02 December 1999 (02.12.99)

International application No.:

PCT/JP99/02644

Applicant's or agent's file reference:

PH-657-PCT

International filing date:

20 May 1999 (20.05.99)

Priority date:

22 May 1998 (22.05.98)

Applicant:

KOBAYASHI, Kazuo et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

06 October 1999 (06.10.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 9/14, 15/55, 15/63, 1/19 // (C12N 15/55, C12R 1:785) (C12N 9/14, C12R 1:865) (C12N 1/19, C12R 1:865)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/61591</p> <p>(43) 国際公開日 1999年12月2日(02.12.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02644</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月20日(20.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/141717 1998年5月22日(22.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 小林和男(KOBAYASHI, Kazuo)[JP/JP] 竹内 誠(TAKEUCHI, Makoto)[JP/JP] 岩松明彦(TWAMATSU, Akiluko)[JP/JP] 吉田 聡(YOSHIDA, Satoshi)[JP/JP] 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) 山本憲二(YAMAMOTO, Kenji)[JP/JP] 〒520-0248 滋賀県大津市仰木の里東6丁目9-3 Shiga, (JP) 熊谷英彦(KUMAGAI, Hidehiko)[JP/JP] 〒520-0112 滋賀県大津市日吉台3丁目32-2 Shiga, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: ENDO-β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE GENE</p> <p>(54)発明の名称 エンドー β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子</p> <p>(57) Abstract An endo-β-N-acetylglucosaminidase gene encoding the following protein (a) or (b): (a) a protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3; and (b) a protein comprising an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 by deletion, substitution, insertion or addition of at least one amino acid and having the activity of endo-β-N-acetylglucosaminidase.</p>		

(57)要約

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子。

(a) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	リトアニア	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TD	チャード
BJ	ベナン	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	IN	インド	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KP	北朝鮮				
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子

技術分野

本発明は新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子に関するものである。詳しくは該遺伝子が *Mucor* 属由来の遺伝子に関するものである。更に本発明は、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該プラスミドにより形質転換された生物、該形質転換体を用いた新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造法に関するものである。

背景技術

糖タンパク質は動植物の組織、真核微生物の細胞膜、壁などに広く存在している。

近年、糖タンパク質の糖鎖が、細胞の分化、癌化、細胞間の認識などの機構に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあり、その機構解明のため糖鎖の構造と機能との相関について研究が進められている。その目的達成のための手段として、糖タンパク質から糖鎖を切り出す際、あるいは糖鎖の構造の同定の際に様々なグリコシダーゼが用いられている。その中でも、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質に存在するアスパラギン結合型糖鎖（N-結合型糖鎖、N 型糖鎖）に作用して、糖鎖中に存在するジアセチルキトビオース部分を切断し糖鎖を遊離する作用を有する。

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質の糖鎖部分をタンパク質部分より遊離することができるため、糖タンパク質糖鎖の構造、機能の解析に重要であると考えられる。

アスパラギン結合型糖鎖は、その構造から高マンノース型（マンナン型糖鎖）、ハイブリッド型及びコンプレックス型に分類される。

従来知られているエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼとしては、Endo H (A. L. Tarentino and F. Maley, *J. Biol. Chem.*, 249, 811 (1974))、Endo F

(K. Takegawa, et al., *Eur. j. Biochem.*, 202, 175 (1991)), EndoA (K. Takegawa, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3107 (1989)) 等が挙げられるが、これらの酵素は特定の構造の糖鎖に対してのみ作用し、また糖タンパク質に対しては変性剤の存在下でなければ作用しない。

ムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*) 由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、高マンノース型 (マンナン型糖鎖)、ハイブリッド型のみならず、コンプレックス型についても三分岐複合糖鎖まで切断能があり、また脱シアル型であれば四分岐複合糖鎖まで切断能があり、さらに、タンパク質を変性処理することなく、糖タンパク質から糖鎖を遊離することができることが知られている (S. Kadowaki, et al., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 97 (1990))。従って、ムコール・ヒエマリス由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質の糖鎖及びタンパク質の機能的、生理的役割を研究する上で有用であるといえる。

一方、酵母由来のマンナン型糖鎖からヒト適応型糖鎖に変換することは物質生産の面では非常に意義があることである。その変換方法としては、酵母の糖鎖合成系を遺伝子操作により改変するという *in vivo* での変換とともに、トランスグリコシレーション反応を利用した *in vitro* での変換が考えられる。糖変換を目的とするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの特性として、1) 基質特異性としてマンナン型、複合型の両方に対して切断能力を持つこと、2) 分解反応の逆反応であるトランスグリコシレーション反応を行う能力を持つことが要求される。従って、*Mucor hiemalis* 由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは上記変換を行うためにふさわしい酵素であるといえる。

なお、本発明者らは、酵母型糖鎖をヒト適応型に変えることができる *Mucor hiemalis* 由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた糖鎖変換技術を提案している (特開平 7-59587 号公報)。

以上の様な糖鎖変換を行うためには大量かつ精製度の高い酵素標品が必要となる。この場合、カビの菌体を用いた従来の育種法により酵素生産性の向上を目指すことも考えられる。しかし、従来の育種方法は、主として、紫外線や変異誘発剤によって得られる変異株から選択する方法に限られていたため、安定な変異体を単離するのが困難であった。また、従来法による育種の場合、好まざる形質

変化を伴うことも多い。更に、一般的にカビは様々なタンパク質分解酵素を生成するため、糖変換を目的とした酵素を生産するには好ましいものではない。従って、これらの問題点を除去するには多段の精製ステップを踏まねばならないため、作業が繁雑となり、かつ酵素の収量も少ない。例えば、毛カビの一種である *Mucor* 属に属する微生物を培養し、その培養上清より酵素の精製を行っても、プロテアーゼの混入を除くことができず、かつ菌体の酵素生産性が低いため大量調製をすることが困難であり、実用上の価値は少なかった。

以上のことから、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを大量生産するためには、該酵素の遺伝子を取得し、遺伝子工学的にそれを生産することが望まれている。さらに、遺伝子を取得出来れば、蛋白工学の技術を用いて、耐熱性、耐 pH 性の向上、反応速度が増大された酵素を得ることも期待できる。しかしながら遺伝子クローニングを試みられているが現在までにその報告はない。

発明の開示

本発明は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、上記 *Mucor hiemalis* 由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列情報をもとに、当該酵素の生産菌であるムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*) から調製した cDNA ライブラリーより当該酵素をコードする遺伝子を取得することに成功し、さらに酵母での発現にも成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の (a) 又は (b) の組換えタンパク質である。

(a) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードするエンド- β -N-

アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、及び該遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA を含む遺伝子である。

(a) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、以下の (c) 又は (d) の DNA を含む遺伝子である。

(c) 配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA

(d) 配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA

上記遺伝子としては、ムコール属に属する微生物（例えばムコール・ヒエマリス）由来のものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記遺伝子を含有する組換えベクターである。

さらに、本発明は、前記組換えベクターを含む形質転換体である。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを採取することを特徴とするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌を培養し、得られる培養物からエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを精製した後、該酵素の部分アミノ酸配列から縮重プローブを設計し、PCR を行うことにより該酵素をコードする遺伝子をクローニングし、さらにエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌の cDNA ライブラリーより該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることを特徴とする。また、本発明は、クローニングされた遺伝子をベクターに組込んで組換えベクターを得るとともに、該組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を得ることを特徴とする。さらに、本発明は、前記形質転換体を培養することにより、大量にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダ

ーゼを生産することを特徴とする。

1. エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌の培養

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する菌としては、ムコール属 (*Mucor* 属) に属する菌体、好ましくはムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*)、より好ましくは工業技術院生命工学技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に寄託されている *Mucor hiemalis* (受託番号 FERM BP-4991) が挙げられる。

これらの菌株の培養に用いる培地組成は通常の微生物の培養に用いられるものであればどのようなものでもよい。

炭素源としては、例えばグルコース、シュクロース、マンノース、ガラクトース、マルトース、可溶性デンプン、デキストリン等の糖質、窒素源としては酵母エキス、トリプトン等が挙げられる。無機塩としては上記の窒素源に含有する無機塩の他に、各種ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩等の塩類が用いられ、場合によってはビタミン類などを添加してもよい。

培養は培地を通常の方法で滅菌し、菌株を接種後、20~30°C、pH 5~7 で2~4日間振とう又は通気攪拌培養を行う。

本発明においては、温度が25~30°C、pHが6、炭素源としてガラクトース、窒素源として酵母エキス、トリプトンを用い、炭素源、窒素源の濃度がともに2~3%、炭素源と窒素源との比が2:3で3~4日間、良好な通気条件で培養することがより好ましい。このような培養条件で培養した場合は、酵素の生産量が最大となり、公知の方法 [S. Kadowaki, et al., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 97 (1990); グルコース 0.5%、酵母エキス 1%、ペプトン 1%] と比較して約10倍の酵素生産性を得ることができる。

なお、本発明においては、微生物を培養する際に通気条件を確保するため、ジャーファーメンターを用いることが好ましい。

2. エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製

上記菌株が生産するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、以下の活性

の保持を特徴とするものである。すなわち、糖タンパク質に存在するアスパラギン結合型糖鎖に作用して、糖鎖中に存在するジアセチルキトビオース部分を切断し、糖鎖を遊離する活性で特徴付けられる。

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製は、公知の分離、精製方法を適当に組み合わせて行なうことができる。例えば塩沈殿、溶媒沈殿のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過およびSDS-ポリアクリル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、さらに等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

本発明においては、前述の通り公知の方法(S. Kadowaki, et al., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 97 (1990))を改良した培養法を採用し、かつ多段の精製ステップを経ることによりエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを効率よく精製することができ、遺伝子を取得するために必要なアミノ酸配列を得る十分量のタンパク質を得ることができる。得られる酵素は、酵素精製の結果、及び後述の遺伝子解析の結果、分子量約 85,000 で単一の遺伝子産物によって構成され、遺伝子の翻訳後の限定分解を経て少なくとも分子量約 60,000 及び 14,000 のペプチドを含む 2 つ以上のサブユニットから構成されることを見出した。

3. 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子のクローニング

Mucor hiemalis より得られるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは少なくとも 2 つ以上のペプチドより構成されていることがわかった。

一般に、ある特定のタンパク質をコードする遺伝子を単離する場合、タンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、その縮重コドンからなる混合オリゴヌクレオチドをプローブとして、遺伝子ライブラリーから目的の遺伝子を単離することが可能である。また、本発明において実施したような PCR による部分断片の取得後、その断片をプローブとして遺伝子ライブラリーから目的の遺伝子を単離することも可能である。

しかしながら、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、2 種類以上のサ

ブユニットからなるヘテロオリゴマー分子であるため、それぞれのサブユニットがそれぞれ異なる遺伝子に独立してコードされる可能性がある。また、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼがひとつの遺伝子から由来するにしても2つのサブユニットをコードする領域が構造遺伝子のなかでどのような位置関係となっているかなど、その構造については明らかではない。

そこで、発明者らは2つのサブユニットの部分アミノ酸配列を決定し、さらにPCRによる部分断片の取得の後、該断片をプローブとしたcDNAのクローニングに成功し、遺伝子構造を解析することによって、これら2つのサブユニットが同一の遺伝子にコードされることを明らかにした。すなわち、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、該酵素をコードする遺伝子から1つのポリペプチドとして生成され、部分分解を受けることにより2つ以上のサブユニットへとプロセスされていることが明らかにされた。

本発明の遺伝子は、例えば以下のようにしてクローニングされる。

(1) エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子のクローニング

本発明において、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼをコードしている遺伝子を含むDNA断片の具体例としては、図2に示される制限酵素地図で表されるDNA断片が挙げられる。この断片は、*Mucor* 属に属する菌体、好ましくは *Mucor hiemalis* 株、より好ましくは工業技術院生命工学技術研究所に受託番号 FERM BP-4991 の番号のもとに寄託されている *Mucor hiemalis* 株より調製される mRNA を鋳型とした cDNA ライブラリーから遺伝子工学的な手法を用いて単離することができる (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook、Maniatis ら、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989))などに記載の方法を参照)。

mRNA の調製は、通常の手法により行うことができる。例えば、mRNA の供給源である *Mucor hiemalis* を培養した後、市販のキット (ISOGEN (ニッポンジーン社)) で処理して全 RNA を得、市販の精製キット (mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech)) を用いて精製することができる。なお、mRNA の調製には mRNA の分解を抑制する意味で培養時間を短くすることが好ましい。

このようにして得られた mRNA を鋳型として、オリゴ dT プライマー及び逆転写

酵素を用いて一本鎖 cDNA を合成した後、該一本鎖 cDNA から二本鎖 cDNA を合成する。得られた二本鎖 cDNA を適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。得られる組換えベクターを用いて大腸菌等を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を選択することにより、cDNA のライブラリーを得ることができる。

ここで、大腸菌の形質転換は、Hanahan の方法 [Hanahan, D.: J. Mol. Biol. 166 : 557-580 (1983)] などに従って行うことができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合はテトラサイクリン、アンピシリン等の薬剤耐性遺伝子を含有することが必要である。また、プラスミド以外のクローニングベクター、例えば λ ファージ等を用いることもできる。

上記のようにして得られる形質転換体から目的の DNA を有する株を選択 (スクリーニング) する。スクリーニング方法としては、例えば、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼのアミノ酸配列に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを合成し、これを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う方法が挙げられる。例えば、鋳型 DNA としては、ゲノム DNA、又は前記 mRNA から逆転写反応により合成された cDNA が挙げられ、プライマーとしては、例えばセンス鎖についてはアミノ酸配列 : PSLQLQPDDK (配列番号 4) に基づいて合成した 5'-CARTTRCARCCNGAYGAYAA-3' (配列番号 5) 及びアミノ酸配列 : SYRNPEIYPTDQNIK (配列番号 6) に基づいて合成した 5'-CCHACNGAYCARAAAYATYAA-3' (配列番号 7) を用いることができる。また、アンチセンス鎖についてはアミノ酸配列 :

SYRNPEIYPTDQNIK (配列番号 6) に基づいて合成した 3'-GGDTGNCTRGTYTTRTARTT-5' (配列番号 8) 及びアミノ酸配列 : QQRFNHRSHDVETEI (配列番号 9) に基づいて合成した 3'-TTYCCDGTGCDAAARTTRGT -5' (配列番号 10) を用いることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。

このようにして得られた DNA 増幅断片を、 ^{32}P 、 ^{35}S 又はビオチン等で標識してプローブとし、これを形質転換体の cDNA ライブラリーを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索することによりスクリーニングすることができる。

(2) 塩基配列の決定

得られたクローンについて塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキシム-ギルバートの化学修飾法、又はジデオキシ法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えば PERKIN-ELMER 社製 377A DNA シークエンサー等）を用いて配列決定が行われる。

配列番号 1 にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全配列を示す。このうち、本発明の遺伝子の好ましい具体例としては、配列番号 1 に示される塩基配列の 71 番目から 2305 番目までの塩基配列（配列番号 2）が挙げられる。また、本発明の遺伝子は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列又は後述する等価配列を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列をもつもののほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものである。

なお、等価配列を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列は、部位特異的突然変異誘発法などを利用して調製することができる。すなわち、Kunkel 法若しくは Gapped duplex 法等の公知手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えば Mutant-K (TAKARA 社製)、Mutant-G (TAKARA 社製)）などを用いて、あるいは、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

また、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子には、配列番号 1 又は 2 に示される塩基配列からなる DNA のほか、該 DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA も含まれる。ストリンジেন্টな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 50~300mM、好ましくは 150mM であり、温度が 50~68°C、好ましくは 65°C での条件をいう。

一旦エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の塩基配列（配列番号 1）が確定すると、該塩基配列の 71 番から 2305 番までの配列を有する DNA 断片（オープンリーディングフレーム）の塩基配列が定まっていることから（配列番号 2）、その後は化学合成によって、又は当該オープンリーディングフレーム（配列番号 2）の 5' および 3' 末端の塩基配列（例えば 5'-ATGCCTTCACTTCAATTGCA ACC-3'（配列番号 11）及び 5'-CTAGTTTAATGACAAATCTATGC-3'（配列番号 12））をブ

ライマーとし、ゲノム DNA を鋳型とした PCR によって、あるいはエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の塩基配列を有する DNA 断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を得ることができる。

なお、本発明の遺伝子を含むプラスミド pZL-Endo（後述する実施例 3 参照）は、大腸菌 *E. coli* DH10B に導入され（名称：DH10BpZL-Endo）、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、平成 10 年 4 月 28 日付で FERM BP-6335 として寄託されている。

本発明において、組換え新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの好ましい具体例としては、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列、またはその等価配列を含んでなるポリペプチドが挙げられる。ここで、「等価配列」とは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、少なくとも 1 個のアミノ酸の挿入、置換若しくは欠失又は両末端への付加がなされたものであって、且つ上記した新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を依然として保持する配列をいう。その等価配列における新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の保持とは、その活性を利用した実際の使用態様において、配列番号 3 に示される配列を全て有するポリペプチドと同一の条件ではほぼ同様の利用が可能な程度の活性が維持されていることをいうものとする。このような等価配列は、配列番号 3 に示されている配列を参照すれば、当業者であれば格別の困難なしに選択し、製造可能であることは明らかである。例えば、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 1 個、好ましくは 1 ～ 10 個、さらに好ましくは 1 ～ 5 個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に少なくとも 1 個、好ましくは 1 ～ 10 個、さらに好ましくは 1 ～ 5 個のアミノ酸が付加又は挿入してもよく、あるいは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 1 個、好ましくは 1 ～ 10 個、さらに好ましくは 1 ～ 5 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。従って、配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において 2 番から 744 番までに示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド（配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目のメチオニンが欠失したもの）も本発明のタンパク質に含まれる。

ここで、本発明による部分アミノ酸配列分析、および遺伝子構造解析によって前駆体ポリペプチドが少なくとも配列番号3に示されるアミノ酸配列の510番目のヒスチジン、及び627番目アスパラギン酸のアミノ酸のC末端側で切断されることにより、天然体の2つ以上のサブユニットが生じたものであることが明らかにされた。

2. 組換えベクター及び形質転換体の作製

本発明においては、本発明の遺伝子を含んだDNA分子、特に発現ベクターが提供される。このDNA分子は、ベクター分子に本発明による新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼをコードするDNA断片を組み込むことによって得ることができる。従って、本発明の新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼをコードする遺伝子断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特に発現ベクターの形態として宿主細胞の形質転換を行なえば、宿主細胞において本発明の新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを産生させることができる。

この発明によるDNA分子の作成は前掲の Molecular Cloning: A Laboratory Manual に記載の方法に準じて行なうことができる。

(1) 組換えベクターの作製

本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案しながら、ウイルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択できる。

例えば、宿主細胞が大腸菌の場合は λ ファージ系のバクテリオファージ、pBR系(pBR322, pBR325等)、pUC系(pUC118, pUC119等)のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド(pUB110等)、酵母の場合はYEp、YCp系のベクター(例えばYEp13, YEp24, YCp50等)、あるいは後記する実施例で使用されるpG-3-Notが挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサ

イトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、形質転換体の選択マーカを含むのが好ましく、選択マーカとしては薬剤耐性マーカ、栄養要求マーカ遺伝子を使用することができる。

さらに、本発明の発現ベクターとしてのDNA分子は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結シグナルなどの転写調節信号、翻訳調節信号などを有しているものが好ましい。

(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、エッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属に属する細菌が挙げられ、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、キャンディダ・ボイジニイ (*Candida boidinii*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等の酵母が挙げられる。

宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母以外に、COS 細胞、CHO 細胞等の動物細胞が挙げられ、あるいは Sf9、Sf21 等の昆虫細胞が挙げられる。

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

大腸菌としては、例えばエッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1、DH5 α 、JM109 などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) MI 114、207-21 などが挙げられる。枯草菌にはタンパク質

を菌体外へ分泌する株が存在することが知られている。またプロテアーゼを殆ど分泌しない株も知られており、このような株を宿主として用いることも好ましい。

プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中でも機能することができるプロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン (lac)、トリプトファンオペロン (trp) 等のプロモーターが挙げられる。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌に DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S.N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69 : 2110-2114 (1972)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シズサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、カンジダ・ウティリス (*Candida utilis*) などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、酸性フォスファターゼ (PHO)、ガラクトース遺伝子 (GAL)、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子 (GAPDH) 等のプロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、AOX1 プロモーター等を好ましく用いることができる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法[Becker, D.M. et al. : Methods. Enzymol., 194 : 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法[Hinnen, A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75 : 1929-1933 (1978)]、酢酸リチウム法 [Itoh, H. : J. Bacteriol., 153 : 163-168 (1983)]等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞 COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞)、マウス L 細胞、ラット GH3、ヒト FL 細胞などが用いられる。プロモーターとして SR α プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、CMV プロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞、Sf21細胞などが用いられる。

昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

4. 本発明のタンパク質の生産

本発明のタンパク質は、本発明の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するもの、または該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に前記変異が導入されたアミノ酸配列を有し、かつエンド- β -D-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するものである。

本発明のタンパク質は、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で12～72

時間行う。培養期間中、pHは4~7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトシド(IPTG)等を、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドール酢酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地、DMEM 培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で2~10日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより本発明のタンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。

組換え新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製は、公知の分離、精製方法を適当に組み合わせて行なうことができる。例えば塩沈殿、溶媒沈殿のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過およびSDS-ポリアクリル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、さらに等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

本発明においては、後記する実施例に示すように、サッカロミセス・セレビシエを宿主として GAPDH プロモーターの支配下にこの遺伝子を発現させたところ、細胞抽出液中に高い酵素活性が認められた。このことにより、組換え体において

本発明の遺伝子を発現することによって活性型の新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを大量に生産可能であることが示された。

図面の簡単な説明

図1は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製結果を示す電気泳動写真である。

図2は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-Endoの制限酵素地図である。

図3は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-EndoのSal I-Not I部位に挿入された断片の全塩基配列を示した図である。

図4は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-EndoのSal I-Not I部位に挿入された断片の全塩基配列を示した図である(図3の続き)。

図5は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、および該アミノ酸をコードするDNAの塩基配列を表す図である。

図6は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、および該アミノ酸をコードするDNAの塩基配列を表す図である(図5の続き)。

図7は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、および該アミノ酸をコードするDNAの塩基配列を表す図である(図6の続き)。

図8は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を含むサッカロミセス・セレビシエ用の発現ベクターpGEndo-SCの構造を表す図である。

図9は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子が導入された酵母での該酵素の発現を示すクロマトグラフの写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。なお、操作手順は特に記

載しない限り Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook、Maniatis ら、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989))に記載の方法に従った。

〔実施例 1〕 酵素活性の測定

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は基本的に、S. Kadowaki, et al., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 97 (1990) に示された方法に従った。すなわち、ダンシル化されたヒトアシアロトランスフェリングリコペプチド (DNS-GP) を基質として用い、pH6.0 のリン酸カリウム緩衝液中 37℃で反応を行い、以下に示す条件で薄層クロマトグラフィー(TLC)、または HPLC により測定した。

TLC での分析条件

展開相：HPTLC シリカゲル 60 (メルク)

溶媒：ブタノール：酢酸：水 = 2 : 1 : 1

検出：蛍光法による検出

HPLC での分析条件

カラム：TSK-gel ODS80TM (東ソー)

移動相：2.5 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5 + 1.1 % アセトニトリル

カラム温度：50℃

流速：0.5 ml/分

検出器：蛍光検出器

活性の定義は上記 HPLC による測定で条件下で、1 分間に 1 μ mol のダンシル化アスパラギルアセチルグルコサミンを生成する酵素量を 1 ユニットと定義した。

〔実施例 2〕 *Mucor hiemalis* の培養

500 ml 容坂口フラスコに 100 ml 培地 (ガラクトース 2 %、酵母エキス 3 %) を仕込み、スラント 3 ~ 5 分の 1 本分の *Mucor hiemalis* 胞子を接種し、28℃で 2 日間培養を行った。mRNA の調製にはこの培養液を吸引ろ過して分離した菌体を用いた。

また酵素の調製については、上記培養液を培養後 3 リットル容ジャーファーマンターに 2 リットルの培地を仕込んだものに移し替え、28℃、回転数 300 ~ 400 rpm、通気量 2 リットル/分の条件で 4 日間培養を行った。

〔実施例 3〕 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製

実施例 2 で得られた培養液 4 リットル分（3 リットル容ジャーファーマンター培養 2 回分）を吸引ろ過して菌体を分離し、限外ろ過（分子量 13000 カット）にて 200 ml まで濃縮したものを粗酵素液とした。これを 5 mM EDTA を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社 Q Sepharose FF、500 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、引き続き 900 ml の 0 M ~ 0.3 M 食塩の線状勾配でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。活性画分に最終濃度が 1 M 硫酸アンモニウム、5 mM EDTA を含む 50 mM リン酸カリウム（pH 7.0）となるように試薬を加え、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマトグラフィー（東ソー社 Phenyl-TOYOPEARL 650S 200 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次に 1 mM の EDTA を含む硫酸アンモニウム 600 ml を用いて、1 M ~ 0 M の線状勾配でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

得られた溶離液を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて 5 ml まで濃縮し、引き続き 0.15 M の食塩、1 mM の EDTA を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）にて洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化したゲル濾過クロマトグラフィー（ファルマシア社 Sephacryl S300）に載せ、同緩衝液にてエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶出した。

活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 1 mM の EDTA を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）にて洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化したヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー（東ソー社 TSK-gel HA1000）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 1 mM の EDTA を含むリン酸カリウム（pH 7.0）30 ml を用いて、0 M ~ 0.3 M の線状勾配でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続きイミノジ酢酸にて pH 7.1 に調製された 25 mM ビス-トリス緩衝液で洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化した等電点クロマトグラフィー（ファルマシア社 MonoP）に通した。カラムを同緩衝液で洗浄し、次いで 50 ml のイミノジ酢酸に

て pH 3.9 に調製された 10%ポリバッファー 74 (ファルマシア社) でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

活性画分を限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、引き続き 1 mM の EDTA を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄、脱塩した。次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー (ファルマシア社 MonoQ) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 30 ml の 0 M ~ 0.3 M 食塩の線状勾配でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを溶離した。

活性画分を限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、引き続き 1 mM の EDTA を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄、脱塩したものを酵素サンプルとした。なお、各カラムクロマトグラフィーはファルマシア社 FPLC を用いて行った。

タンパク質量はバイオラッド社プロテインアッセイキットを用いて、または吸光度 (280 nm) により測定した。タンパク質の分子量、等電点は SDS-PAGE (15-25% グラジエント)、ゲル濾過クロマトグラフィー、IEF-PAGE 等により測定した。

Native-SDSPAGE、IEF-SDSPAGE による 2 次元電気泳動、及び上記クロマトグラフィーにおける各画分の活性と SDS-PAGE 分析の結果から、SDS-PAGE 上で少なくとも 60 kDa (p60 と称する)、及び 1.4 kDa (p14) のバンドが検出された (図 1)。

〔実施例 4〕新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列の決定

部分アミノ酸配列分析は岩松 (生化学 63、139~143(1991)) の方法により行なった。精製酵素を泳動用緩衝液 (10%グリセロール、2.5% SDS、2% 2-メルカプトエタノール、62 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)) に懸濁させて、SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した。泳動後、エレクトロブロットィングにより当該酵素をゲルより 10cm x 7cm の PVD F 膜 ((ProBlot) アブライド バイオシステムズ) へ転写した。エレクトロブロットィング装置としてはザルト ブロット I Is 型 (ザルトリウス社) を用い、エレクトロブロットィングを 160 mA で 1 時間行なった。

転写後、当該酵素の転写された部分の膜を切り取り、その一部を直接気相プロテインシーケンサーで分析し、N末端アミノ酸配列を決定した。また残りの膜は約300 μ lの還元用緩衝液(8M グアニジン塩酸、0.5M トリス塩酸緩衝液(pH 8.5)、0.3% EDTA、2%アセトニトリル)に浸し、1mgのジチオスレイトール(DTT)を加え、アルゴン下で25℃、約1時間の還元を行なった。これに3.0mgのモノヨード酢酸を0.5N水酸化ナトリウム液10 μ lに溶かしたものを加え、遮光下で20分攪拌した。PVDF膜をとりだし、2%アセトニトリルで充分洗浄した後、0.5%ポリビニルピロリドン-40を含む100mM酢酸に浸し、30分間静置した。こののち、PVDF膜を水で充分洗浄し、1mm四方に切断した膜を消化用緩衝液(8%アセトニトリル、90mM トリス塩酸緩衝液(pH 9.0))に浸し、アクロモバクタープロテアーゼI(和光純薬)を1 μ mol加え、室温で15時間消化した。その消化物をC18カラム(和光純薬 Wakosil AR II C18 300Å 2.0X150mm)を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー(日立 L6200)により分離し、各サブユニットについて7種類のペプチド断片を得た。

ペプチドの溶出溶媒としてはA溶媒(0.05%トリフルオロ酢酸)、B溶媒(0.02%トリフルオロ酢酸を含む2-プロパノール/アセトニトリル 7:3)を用い、溶出は、B溶媒に関し2~50%の直線濃度勾配で、0.25mL/minの流速のもと40分間溶出させることにより行なった。

新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ候補タンパク質から得られた断片化ペプチドについてアミノ酸配列分析を行なった。p60由来の断片をp60-AP、p14由来の断片をp14-APと命名した。得られた断片化ペプチドについてのアミノ酸配列決定試験を、気相プロテインシーケンサーPPSO-10型(島津製作所)を用いマニュアルに従って自動エドマン分解法により行なった。

得られた部分アミノ酸配列を表1に記す。

表1 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ候補タンパクの
部分アミノ酸配列

<u>p60</u>		
p60-AP-5	PSLQLQPDDK	(配列番号 17)
p60-AP-6	(K)SYRNPEIYPtDQNIK	(配列番号 18)
p60-AP-8	(K)FNVSSVALQPRVK	(配列番号 19)
p60-AP-9	(K)MDRLFLCGgK	(配列番号 20)
	S	
p60-AP-11	(K)GQRFNHRESHdVETEI	(配列番号 21)
	mal p lllt	
<u>p14</u>		
p14-AP-1	(K)EGYISSSGSIDLSLN	(配列番号 22)

表 1 に記載のアミノ酸配列において、アルファベットの小文字で表されたアミノ酸は、アミノ酸配列上、不確定なアミノ酸を意味する。

部分アミノ酸配列に用いたアクロモバクタープロテアーゼ I はリジン残基のカルボキシル基側を特異的に切断する為、以下の配列に N 末端側に括弧書きで K (リジン) を記す。p60-AP-5 は N 末端アミノ酸配列であることが判明したため、括弧書きの K (リジン) を除いた。

p60 及び p14 のアクロモバクタープロテアーゼ I 消化物については、C18 カラム (ジーエルサイエンス Inertsil ODS-3 0.5x40mm) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (日立 L6200) をオンライン化した質量分析機 (PE Sciex API-III) で質量分析も合わせて行なった。分析結果を表 2 に示す。

表 2 60kDaペプチド (p 6 0) 及び14kDaペプチド(p14)の
/Lys-C消化物LC/MS解析結果

p 6 0					
	実測値	理論値	誤差	対応シーケンス	配列番号
AP-1:	950.50	950.47	+0.03	(K)NIQGNKY	23
AP-2:	1160.50	1160.56	-0.06	(K)YSDYPPPPPK	24
AP-3:	733.25	733.41	-0.16	(K)LSLDASK	25
AP-4:	1838.50	1837.91	+0.59	(K)SYRNPEIYPTDQNIK	18
AP-5:	1141.00	1140.59	+0.41	()PSLQLQDDK p60 N末端	17
	1157.50	1156.75	+0.75	(K)NTDGIFLNYWWK	26
AP-6:	1774.75	1774.94	-0.19	(K)GB*SLRYIYRTLLMK	27
AP-7:	701.50	701.39	+0.11	(K)LTVAB*H p60 C末端	28
	1544.50	1543.79	+0.71	(K)PQLLLTHDMAGGYK	29
	1621.00	1620.73	+0.27	(K)SMNELRDWTPDEK	30
AP-8:	1444.75	1444.83	-0.08	(K)FNVSSVALQPRVK	19
AP-9:	945.75	945.58	+0.17	(K)LAPVSFALK	31
	2655.00	2655.33	-0.33	(K)GQRFNHRESHDVETEISIPLYK	32
AP-10:	2206.75	2206.11	+0.64	(K)ITSSLDB*DHGAFLGGTSLIHK	33
AP-11:	2335.00	2335.16	-0.16	(K)NELFFKNTDGIFLNYWWK	34
p14					
	実測値	理論値	誤差	対応シーケンス	配列番号
AP-1:	888.75	888.45	+0.30	(K)IVIEAVNK	35
AP-2:	1392.50	1392.76	-0.26	()SSRIIQDLFWK p14 N末端	36
AP-3:	1541.50	1541.73	-0.23	(K)EGYISSSGSIDLSLN . . . p14 C末端	22
	1608.50	1608.84	-0.34	(K)TDSSRIIQDLFWK	37

* B はシステイン、カルボキシメチルを表す。

表 2 中、質量 (M+H⁺) において実測値が 701.50 を有する断片は p60-AP-7、実測値が 1541.50 を有する断片は p14-AP-3 の分子量にほぼ一致し、その C 末端のアミノ酸が K (リジン) でないことが分かった。アクロモバクタープロテアーゼ I で消化した断片は、その酵素の基質特異性により、サブユニット自身の C 末端断片以外の断片は K (リジン) が C 末端アミノ酸残基となることから、この断片化ペプチドが p 6 0 及び p 1 4 のサブユニットの C 末端断片であると推定した。

決定された p 6 0 及び p 1 4 の部分アミノ酸配列をタンパク質データベース BLASTP を用いてホモロジー検索を行ったところ、得られた配列は新規であることが示された。以上の結果から p 6 0 及び p 1 4 をエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ候補とし、遺伝子クローニングを行った。

〔実施例 5〕 *Mucor hiemalis* 株 cDNA ライブラリーの作製

まず実施例 2 で得られた菌体 5 g より ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA から mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech) を用いて mRNA を精製した。mRNA より SuperScript™ Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning キット (GIBCO BRL) を用いて cDNA を合成し、Sal I アダプターを接続した後、 λ ZipLox™ Sal I-Not I Arms (GIBCO BRL) に接続 (ライゲーション) した。Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) を用いてパッケージングを行い、*E. coli* Y1090 株に感染させ cDNA ライブラリーを完成させた。

〔実施例 6〕 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ cDNA のクローニング

部分アミノ酸配列 p60-AP-5、p60-AP-6、p60-AP-11 をもとに PCR プライマーを設計した。以下にその配列を示す。使用している記号は全て IUPAC-IUB に基づく。

p60-AP-5

p60-AP-5F 5' CARTTRCARCCNGAYGAYAA 3' (センスプライマー) (配列番号 5)

p60-AP-6

p60-AP-6F 5' CCHACNGAYCARAAAYATYAA 3' (センスプライマー) (配列番号 7)

p60-AP-6R 3' GGDTCNCTRGTYTTRTARTT 5' (アンチセンスプライマー) (配列番号 8)

p60-AP-11

p60-AP-11R 3' TTYCCDGTGCGDAARTTRGT 5' (アンチセンスプライマー) (配列番号 10)

Mucor hiemalis 培養菌体よりフェノール法によりゲノム DNA を調製し、ゲノム PCR (94℃ 30 秒、55℃ 1 分、72℃ 1 分、30 サイクル) を行ったところ、特異的に増幅するバンドが確認された。p60 については p60-AP-5F と p60-AP-11R とのプライマーの組み合わせで 1.7 kb、p60-AP-5F と p60-AP-6R とのプライマー

の組み合わせで 1.5 kb、p60-AP-6F と p60-AP-11R とのプライマーの組み合わせで 0.2 kb の PCR 断片が得られた。この断片について pCR-Script クローニングキット (Stratagene) を用いて pCR-Script Amp にサブクローニングを行なった。制限酵素消化による解析で p60-AP-5F と p60-AP-11R との増幅断片が p60-AP-5F と p60-AP-6R、及び p60-AP-6F と p60-AP-11R との増幅断片を含んでいることが推定されたので、p60-AP-5F と p60-AP-11R との増幅断片の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社 PRISM Ready Reaction キット、及び同社 PRISM 377 DNA シークエンサーを用いて行った。遺伝子解析は日立ソフトウェアエンジニアリング DNASIS 等を用いて行った。

その結果、p60-AP-5F と p60-AP-11R との増幅断片は、決定された他の部分アミノ酸配列を含んでいた。よってこの DNA 断片は p60 遺伝子の一部であることが判明したので、更に PCR 増幅断片の内側の配列を元に新たに DNA プライマーを作成し、実施例 5 で得た mRNA を鋳型とし、Access RT-PCR System (Promega) を用いて RT-PCR (条件はゲノム PCR に同じ) を行った。新たに作成した DNA プライマーの配列は以下のとおりである。

p60-AP-5NF 5' CACTTAAGTCTATGAATGAG 3' (センスプライマー) (配列番号 13)

p60-AP-6NR 3' CGATAGCTTTAGGTCTCTAA 5' (アンチセンスプライマー) (配列番号 14)

その結果、約 1.2 kb の断片が増幅された。増幅された断片の塩基配列を決定したところイントロンを含まない断片が得られたので、この断片をプローブとして cDNA のクローニングを行った。プローブは Megaprime DNA labelling systems (Amersham) を用い α - ^{32}P dCTP (110TBq/mmol) でラベルを行った。

実施例 5 で得られた cDNA ライブラリーからの遺伝子全長の取得はブラックハイブリダイゼーションにより行った。その結果、20 万個ブラックから 5 個のポジティブクローンが得られた。そのうち 4 個のクローンについて 2 次スクリーニングを実施してシングルブラックを得た。更にブラックから得られたファージ液を E. coli DH10B 株に感染させ、ファージから pZL1 由来のプラスミドを回収した。これらのクローンについて制限酵素解析を行い、上流領域を最も長く含むクロー

ンについて塩基配列の解析を行なった。なお、このプラスミドを pZL-Endo と命名する（図 2）。

挿入されていた約 2.3 kb の Sal I-Not I 断片について塩基配列の決定を行なった。すなわち、pBluescript II KS⁺ (Stratagene)、または pUC118(宝酒造)に細分化した断片をサブクローニングし、さらにエキソヌクレアーゼ III およびマニングビーンヌクレアーゼを用いた連続した欠失変異体を作製することにより、種々の変異欠失をもつプラスミドを作製し、DNA シークエンサーを用いて 2370bp からなる Sal I-Not I 断片の配列を決定した（図 3～4、配列番号 1）。

予想される構造遺伝子の領域の解析を行なったところ、744 個から構成されるアミノ酸配列（推定分子量 85 kDa）をコードするオープンリーディングフレームが存在し（図 5～7、配列番号 2）。このアミノ酸配列は決定した p60、及び p14 の部分アミノ酸配列の全てを含んでいることがわかった。p60-AP-5 の N 末端側のとなりのアミノ酸がリジンではなくメチオニンであったことから、このメチオニンをコードする ATG が翻訳のスタートコドンであることを確認した。よって、本発明の酵素の N 末端はプロリンであることが明らかにされた。

一方、質量分析の結果と同様に、p14-AP-3 が本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質の C 末端であることがわかった。また質量分析の結果とも併せ p14 の N 末端の少なくとも一種は、配列番号 2 に示しているアミノ酸配列の 628 番目のセリンであると推定した。

以上のことから、本発明の遺伝子は 5' 領域に p60、3' 領域に p14 をコードすることがわかった。アミノ酸配列から N 末端シグナル配列は見い出されなかったため、本発明の酵素は細胞内タンパク質であると考えられるが、図 1 において複数のバンドが存在することから、本発明の酵素は、菌体の溶菌が原因と思われるタンパク質分解酵素の作用を受けていると考えられた。

〔実施例 7〕 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の発現ベクターの構築

本実施例では、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、及び GAPDH 遺伝子プロモーター-PGK ターミネーターを含む、TRP1 遺伝子を相補するサッカロ

ミセス・セレビスエ組み込み用発現ベクターの構築を行った。

実施例 3 で確認した 744 アミノ酸をコードしているオープンリーディングフレームを得るために、両端に Not I サイトを付加した N 末端、C 末端のアミノ酸配列に相当する DNA 配列に基づく DNA プライマーを合成し、pZL-Endo を鋳型として PCR を行ない増幅断片を得た。以下にセンス、アンチセンスのプライマー配列を記す。

Endo-Not-F (センスプライマー)

5' GGGGCGGCCGCTTTTATTTTACATAAATATGCCTTCACTTC 3' (配列番号 15)

Endo-Not-R (アンチセンスプライマー)

5' CCCGCGGCCGCTAGTTTAATGACAAATCTATGCTACC 3' (配列番号 16)

増幅された断片をアガロースゲル電気泳動にて分離後、Prep-A-Gene DNA Purification System (Bio-Rad) を用いて回収、精製した。更にこの断片を Not I で消化後、精製し、pBluescript II KS+ の Not I に挿入し、pBlue-Endo-Not を作製した。

新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子はカビ由来の遺伝子であることから酵母での発現が適していると考え、サッカロミセス・セレビスエのグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子のプロモーター、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 遺伝子ターミネーター、及びトリプトファン合成遺伝子 TRP1 遺伝子を含む、trp1 遺伝子を選択マーカーとするサッカロミセス・セレビスエ用の発現プラスミドを、発現ベクター pG-3 (Methods in Enzymology Vol. 194 p.389) をベースに作製した。pG-3 を BamH I で消化し、クレノウ処理により平滑末端とし、Not I リンカーを付加して pG-3-Not を作製した。

前述の pBlue-Endo-Not を Not I で消化し、約 2.3 kb の挿入断片をアガロースゲル電気泳動により分離精製し、これを pG-3-Not の NotI 部位に挿入し、pGEndo-SC を構築した (図 8)。

〔実施例 8〕新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼのサッカロミセス・セレビスエでの発現

宿主として酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH 5 0 0 株 (Strategene) の pep4 遺伝子破壊株を用いた。pep4 遺伝子破壊株については Sikorski, R. S. と Hieter, P の方法 (Genetics 122 巻 19-27 (1989)) により作成した。1 0 μ g の pGEndo-SC を用いて上記株を形質転換した。形質転換は酢酸リチウム法 (WO/95/32289 号参照) により行い、形質転換体はトリプトファンを含まない培地プレート (酵母ニトロゲンベース 0.67%、カザミノ酸 0.5%、グルコース 1%) にて選択した。

得られた形質転換について、菌体内の新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性確認を行なった。5 mL の YPD 培地 (酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、グルコース 2%) 中、3 0 $^{\circ}$ C で 2 日間培養した菌について、1 5 0 0 g、5 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心を行い培養上清と菌体を分離し、菌体は蒸留水で洗浄した。菌体に、50mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.0) と 5mM EDTA との混合液を 1 0 0 μ リットル加えよく懸濁した。更に 5 0 mg のガラスビーズを加え、激しく攪拌した後遠心し、上清を細胞抽出液とした。

活性測定は、基質として DNS-GP を用いて TLC または HPLC で行った。TLC での結果を図 9 に示す。Mucor hiemalis 培養上清より精製した酵素と反応させたサンプルと同様に、pGEndo-SC 生成物であるダンシル化アスバラギルアセチルグルコサミン (DNS-Asn-GlcNAc) と一致するピークが得られた。一方、ネガティブコントロールである、pG-3-Not で形質転換した株の培養上清を用いたものからは DNS-Asn-GlcNAc に対応するピークは検出されなかった。そこで pGEndo-SC の細胞抽出液を 1 0 倍濃縮し、脱塩を行ったものを粗酵素として、DNS-GP と反応させ、DNS-Asn-GlcNAc に対応するピークを上記条件の HPLC を用いて分取した。分取したサンプルをエバポレーターで濃縮し、マススペクトル分析を行った。その結果、分取したサンプルの分析結果が DNS-Asn-GlcNAc の分析結果と一致することを確認した。従って、pGEndo-SC の挿入断片にコードされている遺伝子産物は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼであることが分かった。

表 3 に培地 1 mL あたりの本新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性 (生産量) を示す。この活性は Mucor hiemalis の値の 48 倍であった。

表 3 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性

	活性 (ユニット/リットル)
M. hiemalis 培養上清	0.9
エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ 遺伝子導入 <i>S. cerevisiae</i> 培養液 ^(注)	43.2

注) 培養液を集菌後、菌体をガラスビーズで破碎しその遠心分離後の上清の活性を測定し、その値から培養液当たりの活性を算出した。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願第平 10-141717 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明により、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの製造方法が提供される。

本発明の遺伝子を含有するベクターを宿主に導入し、遺伝子を発現させることによってエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを効率的、大量に生産することができる。

本発明の酵素は、糖鎖の分析、解析、及び糖鎖の改変を行う上で産業上重要な酵素であり、本発明によって得られた形質転換体は本酵素を著量に生産し、これら酵素を用いる産業界に大いに貢献することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 4 : エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列。

配列番号 5 : エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 5 : n は a、g、c 又は t を表す (存在位置 1 2) 。

配列番号 6 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列。

配列番号 7 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 7 : n は a、g、c 又は t を表す (存在位置 6) 。

配列番号 8 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 8 : n は a、g、c 又は t を表す (存在位置 1 5) 。

配列番号 9 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列。

配列番号 10 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの部分アミノ酸配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 11 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の 5'末端領域のオリゴヌクレオチド配列。

配列番号 12 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の 3'末端領域のオリゴヌクレオチド配列。

配列番号 13 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 14 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 15 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 16 : エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子配列から設計したオリゴヌクレオチド。

配列番号 20 : Xaa は Met 又は Ser を表す (存在位置 2) 。

配列番号 21 : Xaa は Gly 又は Met を表す (存在位置 2) 。

配列番号 21 : Xaa は Gln 又は Ala を表す (存在位置 3) 。

配列番号 21 : Xaa は Arg 又は Leu を表す (存在位置 4) 。

配列番号 21 : Xaa は Asn 又は Pro を表す (存在位置 6) 。

配列番号 21 : Xaa は Arg 又は Leu を表す (存在位置 8) 。

配列番号 2 1 : Xaa は Glu 又は Leu を表す (存在位置 9) :

配列番号 2 1 : Xaa は Ser 又は Leu を表す (存在位置 1 0) 。

配列番号 2 1 : Xaa は His 又は Thr を表す (存在位置 1 1) 。

配列番号 2 7 : カルボキシメチルシステイン (存在位置 3) 。

配列番号 2 8 : カルボキシメチルシステイン (存在位置 6) 。

配列番号 3 3 : カルボキシメチルシステイン (存在位置 8) 。

請求の範囲

1. 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。
 - (a) 配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質
2. 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子。
 - (a) 配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質
3. 以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子。
 - (c) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNA
 - (d) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA
4. 請求項2記載の遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子。
5. 遺伝子が、ムコール属に属する微生物由来のものである請求項2～4のいずれか1項に記載の遺伝子。
6. ムコール属に属する微生物がムコール・ヒエマリスである請求項5記載の遺伝子。
7. 請求項2～6のいずれか1項に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターを含む形質転換体。
9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを採取することを特徴とするエンド- β -N-アセチル

グルコサミニダーゼの製造方法。

E P

US

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)

〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 PH-657-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/J P 9 9 / 0 2 6 4 4	国際出願日 (日.月.年) 2 0 . 0 5 . 9 9	優先日 (日.月.年) 2 2 . 0 5 . 9 8	
出願人 (氏名又は名称) 麒麟麦酒株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N9/14, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/19 //(C12N15/55, C12R1:785) (C12N9/14, C12R1:865)
(C12N1/19, C12R1:865)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N9/14, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Agric. Biol. Chem. 54 [1] (1990) Kadowaki S et al. "Purification and Characterization of a Novel Fungal Endo- β-N-acetylglucosaminidase Acting on Complex Oligosaccharides of Glycoproteins" p. 97-106	1-9
Y	Sambrook J., Fritsch F. E., Maniatis T. et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)" (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 08. 99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



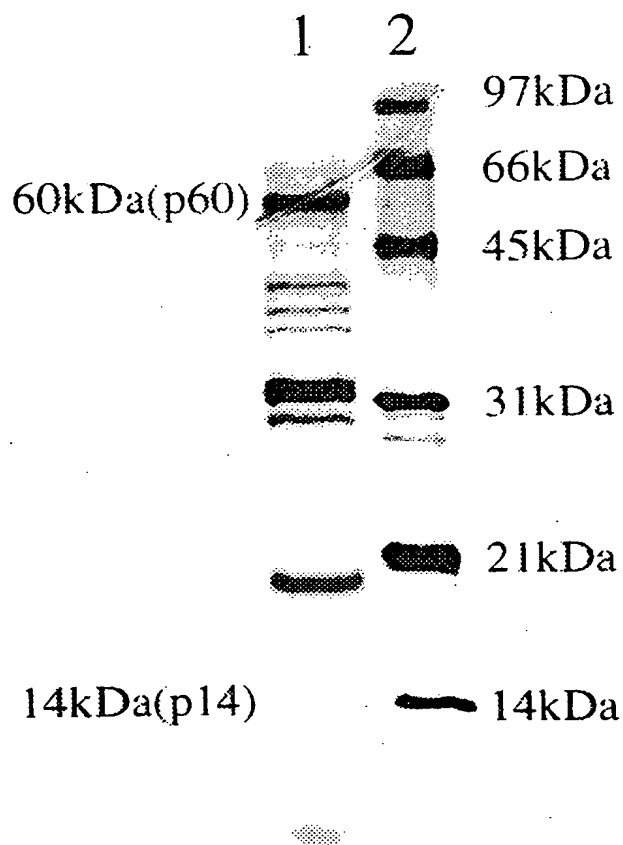


図1 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製結果
(15-25%グラジエントSDS-PAGE)

レーン1 : *Mucor hiemalis*由来精製エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

レーン2 : 分子量マーカー

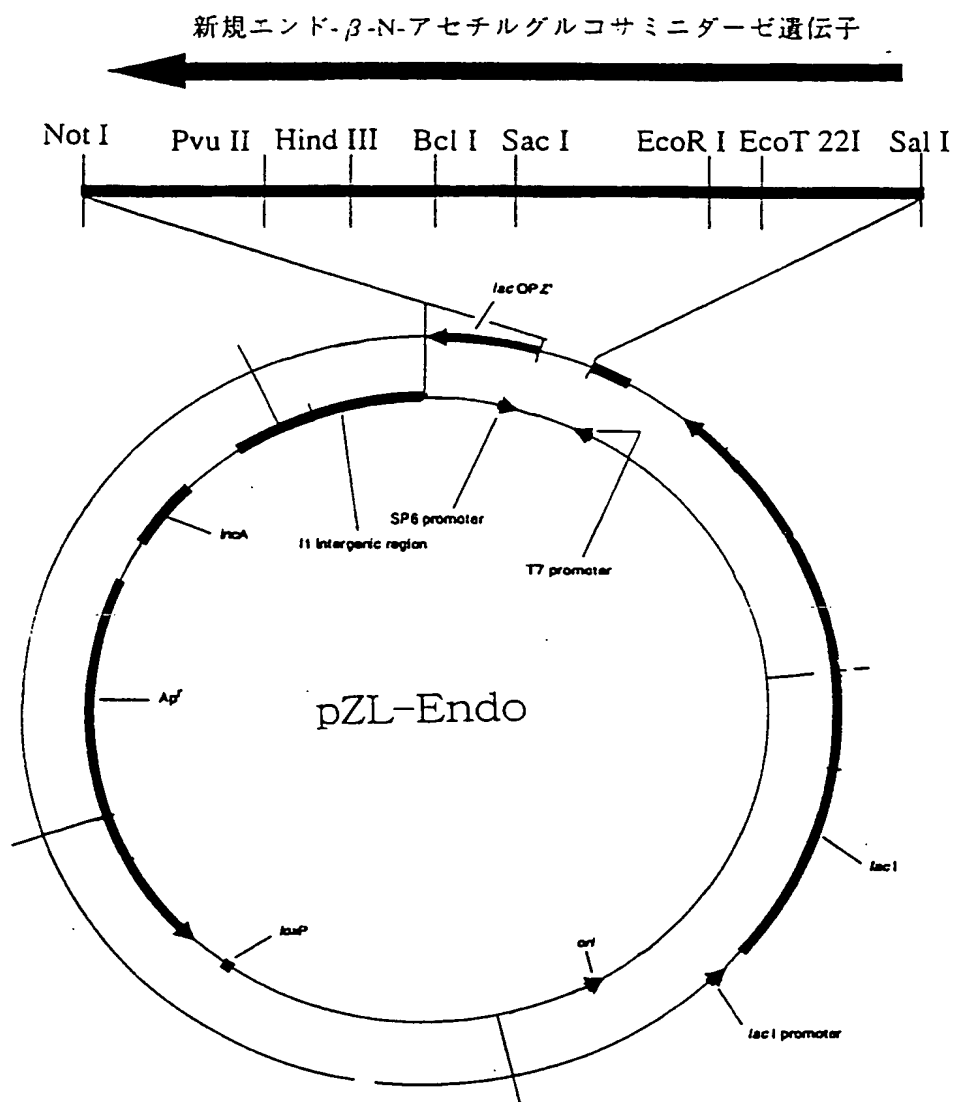


図2 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含むpZL-Endoの制限酵素地図

```

      10      20      30      40      50      60
GTGACCCAC GCGTCCCGG ACGCGTGGG GGACGCGTG GCGGACGCGT GGGTTTTATT

      70      80      90     100     110     120
TTACATAAAT ATGCCCTTCAC TTCAATTGCA ACCTGATGAC AAAC TAGCAC CTGTTTCTTT

     130     140     150     160     170     180
TGCACTTAAG TCTATGAATG AGTTGAGGGA CTGGACGCCA GACGAAAAGA TAAAGTTTAA

     190     200     210     220     230     240
CGTTTCAAGC GTGGCACTAC AGCCTCGTGT GAAAAACGCC CTGAAACCTC AATTATTGTT

     250     260     270     280     290     300
AACTCATGAT ATGOCAGGAG GATATAAAGA AGATAAAAAT ATTCAAGGAA ACAATTATAA

     310     320     330     340     350     360
AGACATTIAT AACATTCAAT ATTGGCATTI AGCTGATACT TTTGTATATT TCTCTCATGA

     370     380     390     400     410     420
GCGAGTTAGC ATTCTCTCCAG TCAATTGGAC AAATGCTTGT CATAGAAATG GTGTAAAGTG

     430     440     450     460     470     480
TTTAGGTACT TTTT TAGTAG AAGGAAATAA CCAAATGCAT GAAATGGAAG CCTTGCTTCA

     490     500     510     520     530     540
CGGTCCACCT TTA CTTAATA AACTGACGA CCTATGAGA TTATGGAGTC CGTATTATGC

     550     560     570     580     590     600
AGACCAATTA GTTGCTATTG CTAAACACTA TGGTTTGTAT GGCTGGTTGT TCAATATTGA

     610     620     630     640     650     660
ATGCGAATTC TTTCTTTTTC CTACAAATCC AAAATTCAAA GCTGAAGAGT TGGCAAAGTT

     670     680     690     700     710     720
TCTACACTIAT TTTAAGGAAA AATTGCATAA CGAAATACCT GGATCTCAAC TCATTTTGGTA

     730     740     750     760     770     780
CGACAGCATG ACAAATGAAG GAGAAATCCA CTGGCAGAAC CAGCTCACAT GGAAAAATGA

     790     800     810     820     830     840
GTTATTTTTT AAAAACACGG ATGGTATTTT TTTGAATTAT TGGTGGAAAA AAGAATACCC

     850     860     870     880     890     900
TGAAATGGCG CGTAGAGTAG CTGAAGGAAT AGGTAGATCA GGTTEAGAAG TTTATTTTGG

     910     920     930     940     950     960
TACAGATGTA TGGGGAAGGC ATACTTATGG TGGCGTGGT TTCAAATCAT ATAAGGGTGT

     970     980     990    1000    1010    1020
AAAAACTGCC TACTCTGCAA TGACATCTTC TGCAATTATT GGTATGGCAT GGACATACGA

    1030    1040    1050    1060    1070    1080
GCATTTGGA AAGTCTGAAT TTGAAAAGAT GGATCGTTTG TTTTGGTGTG GTGGTAAATA

    1090    1100    1110    1120    1130    1140
CTCTGACTAT CCTCCCCCAC CTCCTAAAAA CCCAGATGAC GAAAAAGAAG TAGAAAGCGA

    1150    1160    1170    1180    1190    1200
TGATAGTGAA GATGAGCTCA TGTACGGACA CAAGAAAGGT ATTGCTGACA CGGTAGAATC

    1210    1220    1230    1240    1250    1260
TATTCTGTGA CCAGGAACAG ATTGGTTTGT TACCAATTTT GATAGGGGGT TTGGAAATAG

    1270    1280    1290    1300    1310    1320
GTTTATTIAT AGAGGAAAGA GATTACTTTC TCAGCCTTGG TCCCATTTAT CGCATCAAGC

    1330    1340    1350    1360    1370    1380
TATTCTCCCC AATAAAAGCT ATCGAAATCC AGAGATTTAT CCCACTGATC AAAACATTAA

```

図3 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含む pZL-EndoのSal I-Not I部位に挿入された断片の全塩基配列


```

1390      1400      1410      1420      1430      1440
AATCACTAGT TCTCTCGATT GCGATCATGG AGCTTTTCTT GGTGGAACCT CGCTTATTAT

1450      1460      1470      1480      1490      1500
CAAAGGCCAA CGTTTCAATC ATAGAGAATC GCATGATGTT GAAACTGAAA TTAGTATACC

1510      1520      1530      1540      1550      1560
TCTGTEATAAG CTTTCATTAG ATGCTAGTAA AGGATGCTCA TTGCGTTATA TTTATAGAAC

1570      1580      1590      1600      1610      1620
TTTGTTCATG AAAGATGTAA AGTTGACAGT AGCATGTCAC TTTTCGTTAA AAACAAACGA

1630      1640      1650      1660      1670      1680
CTCAGTTAAT TTCTTCAAGG TATGCCAGCC AGATGAAAAT TTCTCTTTTG AATATGATGA

1690      1700      1710      1720      1730      1740
TGGAATGAGA GCCACTGTTA CAACTGAAAA TTCTACCGAA AGCAGATGCT TTTTATTACG

1750      1760      1770      1780      1790      1800
TACAACAGAA GAAGATACAG GAGAAAATGA TTGGATAACA AAAACTATTA ATGTGCCTGC

1810      1820      1830      1840      1850      1860
TGTTCCAGAA GGAAGTCAAT TATACATTAC AAGACTTGAA GTGAGCGTAG TATTAGATAC

1870      1880      1890      1900      1910      1920
AGCTGGTTTA GTAGGTCTTG TTAATCAAGT TATTGCTTGC TTGGGATATA TTAGCATCAT

1930      1940      1950      1960      1970      1980
ACCAACTATA AATTCTGGAA TAAAAACAGA TTCATCACGC ATTATTCAGG ATCTCTTTTG

1990      2000      2010      2020      2030      2040
GAAAGATCAG AAATATACCA AAATCGGAAA AGAAAGTTTA GACGACATAG CTCAAGAAGA

2050      2060      2070      2080      2090      2100
AGTTCATAGA TATTATGGAA CATTGAACTG GGAAAACACA GCAAATGTAG TAAACCGTTG

2110      2120      2130      2140      2150      2160
GGAGGAAATA GATTACTACA ACGTTTTTTA CAAAGAAAGT GACGACTCTG CAACTCGCAT

2170      2180      2190      2200      2210      2220
CTTTTATAGG ACAGCATTCT GTAATCAATT TCGTGTATCT GGTTTAGATA TTATTTTATC

2230      2240      2250      2260      2270      2280
TAAGCTACCA AAGATAGTTA TTGAAGCTGT TAACAAAGAA GGATACATCT CTTCAAGTGG

2290      2300      2310      2320      2330      2340
TAGCATAGAT TTGTCATTAA ACTAGGACTT GAAATAAAAT ATTATGATAA AGAAAAAATA

2350      2360      2370      2380      2390      2400
AAAAAATAAA AAAAAAAG GCGGCCCGC. ....

```

図 4 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の全長を含む pZL-Endoの Sal I-Not I 部位に挿入された断片の全塩基配列 (続き)

5'	ATG	CCT	TCA	CTT	CAA	TTG	CAA	CCT	GAT	GAC	AAA	CTA	GCA	CCT	GTT	TCT	TTT	GCA	
	M	P	S	L	Q	L	Q	P	D	D	K	L	A	P	V	S	F	A	
	CTT	AAG	TCT	ATG	AAT	GAG	TTG	AGG	GAC	TGG	ACG	CCA	GAC	GAA	AAG	ATA	AAG	TTT	
	L	K	S	M	N	E	L	R	D	W	T	P	D	E	K	I	K	F	
	AAC	GTT	TCA	AGC	GTG	GCA	CTA	CAG	CCT	CGT	GTG	AAA	AAC	CCC	CTG	AAA	CCT	CAA	
	N	V	S	S	V	A	L	Q	P	R	V	K	N	A	L	K	P	Q	
	TTA	TTG	TGA	ACT	CAT	GAT	ATG	GCA	GGA	GGA	TAT	AAA	GAA	GAT	AAA	AAT	ATT	CAA	
	L	L	L	T	H	D	M	A	G	G	Y	K	E	D	K	N	I	Q	
	GGA	AAC	AAT	TAT	AAA	GAC	ATT	TAT	AAC	ATT	CAA	TAT	TGG	CAT	TGA	GCT	GAT	ACT	
	G	N	N	Y	K	D	I	Y	N	I	Q	Y	W	H	L	A	D	T	
	TTT	GTA	TAT	TTC	TCT	CAT	GAG	CGA	GTT	AGC	ATT	CCT	CCA	GTC	AAT	TGG	ACA	AAT	
	F	V	Y	F	S	H	E	R	V	S	I	P	P	V	N	W	T	N	
	GCT	TGT	CAT	AGA	AAT	GGT	GTA	AAG	TGT	TTA	GGT	ACT	TTT	TGA	GTA	GAA	GGA	AAT	
	A	C	H	R	N	G	V	K	C	L	G	T	F	L	V	E	G	N	
	AAC	CAA	ATG	CAT	GAA	ATG	GAA	GCC	TTG	CTT	CAC	GGT	CCA	CCT	TGA	CTT	AAT	AAC	
	N	Q	M	H	E	M	E	A	L	L	H	G	P	P	L	L	N	N	
	ACT	GAC	GAC	CCT	ATG	AGA	TGA	TGG	AGT	CCG	TAT	TAT	GCA	GAC	CAA	TGA	GTT	GCT	
	T	D	D	P	M	R	L	W	S	P	Y	Y	A	D	Q	L	V	A	
	ATT	GCT	AAA	CAC	TAT	GGT	TTT	GAT	GGC	TGG	TTG	TTT	AAT	ATT	GAA	TGC	GAA	TTC	
	I	A	K	H	Y	G	F	D	G	W	L	F	N	I	E	C	E	F	
	TTT	CCT	TTT	CCT	ACA	AAT	CCA	AAA	TTT	AAA	GCT	GAA	GAG	TTG	GCA	AAG	TTT	CTA	
	F	P	F	P	T	N	P	K	F	K	A	E	E	L	A	K	F	L	
	CAC	TAT	TTT	AAG	GAA	AAA	TTG	CAT	AAC	GAA	ATA	CCT	GGA	TCT	CAA	CTC	ATT	TGG	
	H	Y	F	K	E	K	L	H	N	E	I	P	G	S	Q	L	I	W	
	TAC	GAC	AGC	ATG	ACA	AAT	GAA	GGA	GAA	ATC	CAC	TGG	CAG	AAC	CAG	CTC	ACA	TGG	
	Y	D	S	M	T	N	E	G	E	I	H	W	Q	N	Q	L	T	W	

図5 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列

711	720	729	738	747	756
AAA AAT GAG TTA TTT TTT AAA AAC ACG GAT GGT ATT TTT TTG AAT TAT TCG TCG					
K N E L F F K N T D G I F L N Y W W					
765	774	783	792	801	810
AAA AAA GAA TAC CCT GAA ATG GCG CGT AGA GTA OCT GAA GGA ATA GGT AGA TCA					
K K E Y P E M A R R V A E G I G R S					
819	828	837	846	855	864
GGT TTA GAA GTT TAT TTT GGT ACA GAT GTA TGG GGA AGG CAT ACT TAT GGT GGC					
G L E V Y F G T D V W G R H T Y G G					
873	882	891	900	909	918
GGT GGT TTC AAA TCA TAT AAG GGT GTA AAA ACT GCC TAC TCT GCA ATG ACA TCT					
G G F K S Y K G V K T A Y S A M T S					
927	936	945	954	963	972
TCT GCA TTA TTT GGT ATG GCA TGG ACA TAC GAG CAT TTC GAA AAG TCT GAA TTT					
S A L F G M A W T Y E H F E K S E F					
981	990	999	1008	1017	1026
GAA AAG ATG GAT CGT TTG TTT TGG TGT GGT GGT AAA TAC TCT GAC TAT CCT CCC					
E K M D R L F W C G G K Y S D Y P P					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
CCA CCT CCT AAA AAC CCA GAT GAC GAA AAA GAA GTA GAA AGC GAT GAT AGT GAA					
P P P K N P D D E K E V E S D D S E					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
GAT GAG CTC ATG TAC GGA CAC AAG AAA GGT ATT GCT GAC ACG GTA GAA TCT ATT					
D E L M Y G H K K G I A D T V E S I					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
CCT GTA CCA GGA ACA GAT TGG TTT GTT ACC AAT TTT GAT AGG GGG TTT GGA AAT					
P V P G T D W F V T N F D R G F G N					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
AGG TTT TAT TAT AGA GGA AAG AGA TTA CTT TCT CAG CCT TGG TCC CAT TTA TCG					
R F Y Y R G K R L L S Q P W S H L S					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
CAT CAA GCT ATT CTC CCC AAT AAA AGC TAT CGA AAT CCA GAG ATT TAT CCC ACT					
H Q A I L P N K S Y R N P E I Y P T					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
GAT CAA AAC ATT AAA ATC ACT AGT TCT CTC GAT TGC GAT CAT GGA OCT TTT CTT					
D Q N I K I T S S L D C D H G A F L					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
GGT GGA ACC TCG CTT ATT ATC AAA GGC CAA CGT TTC AAT CAT AGA GAA TCG CAT					
G G T S L I I K G Q R F N H R E S H					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
GAT GTT GAA ACT GAA ATT AGT ATA CCT CTG TAT AAG CTT TCA TTA GAT GCT AGT					
D V E T E I S I P L Y K L S L D A S					

図6 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列

(続き)

```

1467      1476      1485      1494      1503      1512
AAA GCA TGC TCA TTG CGT TAT ATT TAT AGA ACT TTG TTG ATG AAA GAT GTA AAG
---
K   G   C   S   L   R   Y   I   Y   R   T   L   L   M   K   D   V   K

1521      1530      1539      1548      1557      1566
TTG ACA GTA GCA TGT CAC TTT TCG TTA AAA ACA AAC GAC TCA GTT AAT TTC TTC
---
L   T   V   A   C   H   F   S   L   K   T   N   D   S   V   N   F   F

1575      1584      1593      1602      1611      1620
AAG GTA TGG CAG CCA GAT GAA AAT TTC TCT TTT GAA TAT GAT GAT GGA ATG AGA
---
K   V   W   Q   P   D   E   N   F   S   F   E   Y   D   D   G   M   R

1629      1638      1647      1656      1665      1674
GCC ACT GTT ACA ACT GAA AAT TCT ACC GAA AGC AGA TGC TTT TTA TTA CGT ACA
---
A   T   V   T   T   E   N   S   T   E   S   R   C   F   L   L   R   T

1683      1692      1701      1710      1719      1728
ACA GAA GAA GAT ACA GGA GAA AAT GAT TGG ATA ACA AAA ACT ATT AAT GTG CCT
---
T   E   E   D   T   G   E   N   D   W   I   T   K   T   I   N   V   P

1737      1746      1755      1764      1773      1782
GCT GTT CCA GAA GGA AGT CAA TTA TAC ATT ACA AGA CTT GAA GTG AGC GTA GTA
---
A   V   P   E   G   S   Q   L   Y   I   T   R   L   E   V   S   V   V

1791      1800      1809      1818      1827      1836
TTA GAT ACA GCT GGT TTA GTA GGT CTT GTT AAT CAA GTT ATT GCT TGC TTG GGA
---
L   D   T   A   G   L   V   G   L   V   N   Q   V   I   A   C   L   G

1845      1854      1863      1872      1881      1890
TAT ATT AGC ATC ATA CCA ACT ATA AAT TCT GGA ATA AAA ACA GAT TCA TCA CGC
---
Y   I   S   I   I   P   T   I   N   S   G   I   K   T   D   S   S   R

1899      1908      1917      1926      1935      1944
ATT ATT CAG GAT CTC TTT TGG AAA GAT CAG AAA TAT ACC AAA ATC GGA AAA GAA
---
I   I   Q   D   L   F   W   K   D   Q   K   Y   T   K   I   G   K   E

1953      1962      1971      1980      1989      1998
AGT TTA GAC GAC ATA GCT CAA GAA GAA GTT CAT AGA TAT TAT GGA ACA TTG AAC
---
S   L   D   D   I   A   Q   E   E   V   H   R   Y   Y   G   T   L   N

2007      2016      2025      2034      2043      2052
TGG GAA AAC ACA GCA AAT GTA GTA AAC GCT TGG GAG GAA ATA GAT TAC TAC AAC
---
W   E   N   T   A   N   V   V   N   A   W   E   E   I   D   Y   Y   N

2061      2070      2079      2088      2097      2106
GTT TTT TAC AAA GAA AGT GAC GAC TCT GCA ACT CGC ATC TTT TTA GGA ACA GCA
---
V   P   Y   K   E   S   D   D   S   A   T   R   I   F   L   G   T   A

2115      2124      2133      2142      2151      2160
TTC TGT AAT CAA TTT CGT GTA TCT GGT TTA GAT ATT ATT TTA TCT AAG CTA CCA
---
P   C   N   Q   P   R   V   S   G   L   D   I   I   L   S   K   L   P

2169      2178      2187      2196      2205      2214
AAG ATA GTT ATT GAA GCT GTT AAC AAA GAA GGA TAC ATC TCT TCA AGT GGT AGC
---
K   I   V   I   E   A   V   N   K   E   G   Y   I   S   S   S   G   S

2223      2232
ATA GAT TTG TCA TTA AAC TAG 3'
---
I   D   L   S   L   N   *

```

図 7 新規エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列

(続き)

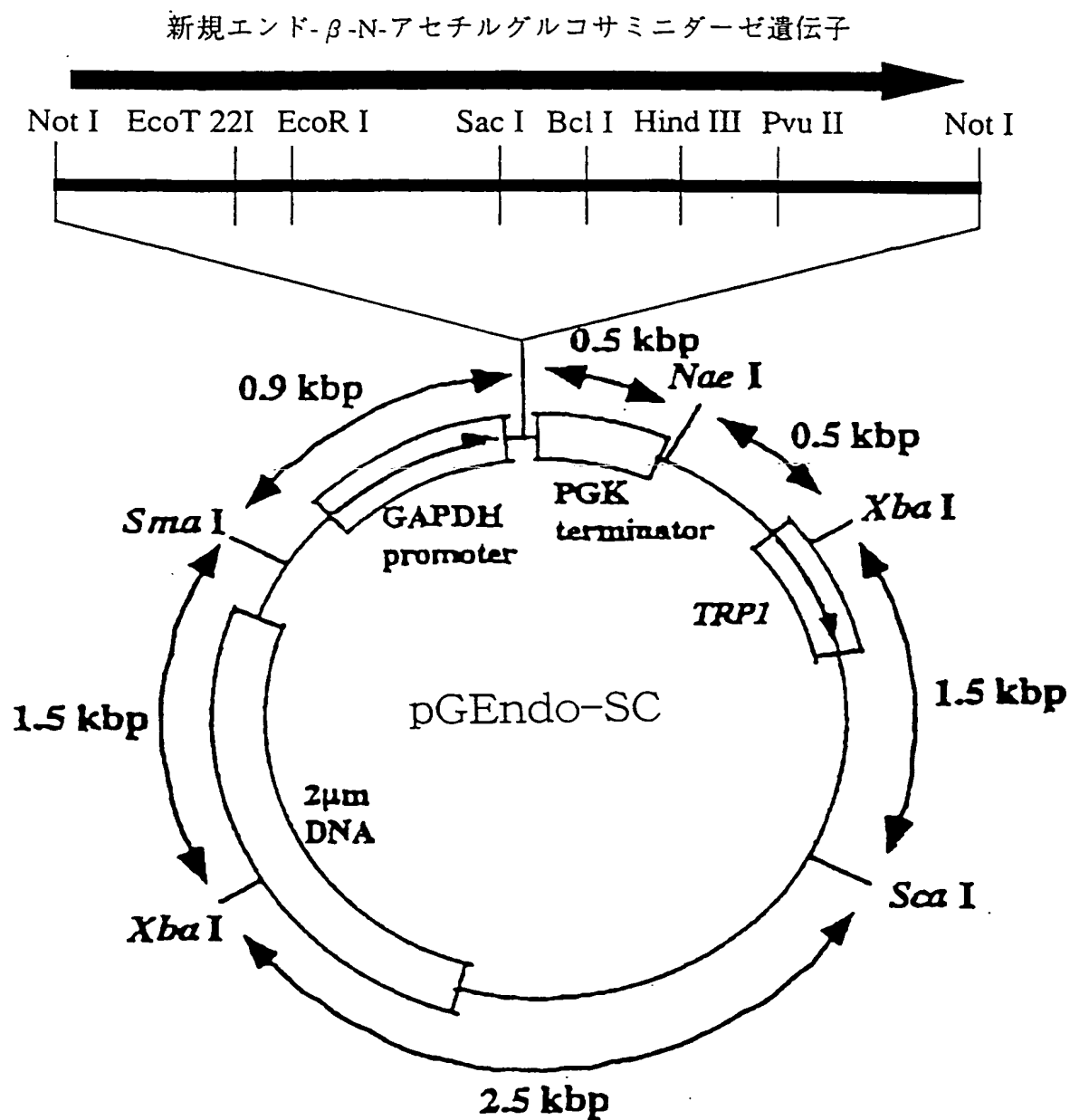


図 8 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を含む
サッカロミセス セレビスエ用の発現ベクターpGEndo-SCの構造

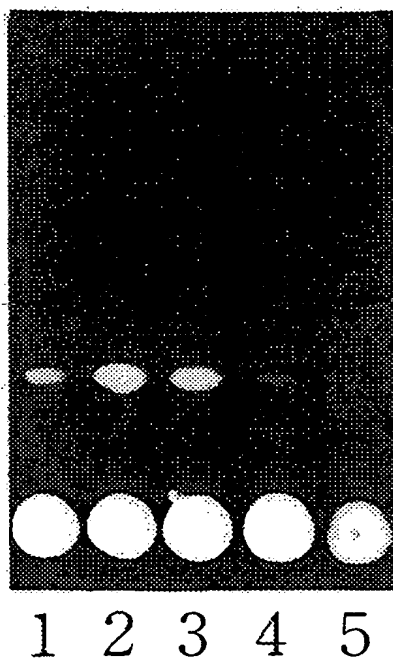


図9 新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子が
導入された酵母での該酵素の発現

レーン1～3：エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を導入した
S. cerevisiae YPH500 (pep4)細胞抽出液

レーン4： *M. hiemalis*由来精製エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

レーン5： *S. cerevisiae* YPH500 (pep4)細胞抽出液

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Endo- β -N-Acetylglucosaminidase Gene

<130> PH-657-PCT

<140>

<141>

<150> JP98/141717

<151> 1998-05-22

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2369

<212> DNA

<213> *Mucor hiemalis*

<400> 1

gtcgaccac gcgtccgcgg acgcgtgggc ggacgcgtgg gcggacgcgt gggttttatt 60
ttacataaat atgccttcac ttcaattgca acctgatgac aaactagcac ctgtttcttt 120
tgcacttaag tctatgaatg agttgaggga ctggacgccca gacgaaaaga taaagtttaa 180

cgtttcaagc gtggcactac agcctcgtgt gaaaaacgcc ctgaaacctc aattattgtt 240
aactcatgat atggcaggag gatataaaga agataaaaat attcaaggaa acaattataa 300
agacatttat aacattcaat attggcattt agctgatact tttgtatatt tctctcatga 360
gcgagttagc attccctccag tcaattggac aaatgcttgt catagaaatg gtgtaaagtg 420
tttaggtact tttttagtag aaggaaataa ccaaatgcat gaaatggaag ccttgcttca 480
cgggccacct ttacttaata aactgacga ccctatgaga ttatggagtc cgtattatgc 540
agaccaatta gttgctattg ctaaacacta tggttttgat ggctggttgt tcaatattga 600
atgcgaattc tttccctttc ctacaaatcc aaaattcaaa gctgaagagt tggcaaagtt 660
tctacactat ttttaaggaaa aattgcataa cgaaatacct ggatctcaac tcatttggtg 720
cgacagcatg acaaatgaag gagaaatcca ctggcagaac cagctcacat ggaaaaatga 780
gttatTTTTT aaaaacacgg atggatTTTT ttTgaattat tggTggaaaa aagaataccc 840
tgaaatggcg cgtagagtag ctgaaggaat aggtagatca ggTTtagaag tttatTTTgg 900
tacagatgta tggggaaggc atacttatgg tggcggtggT ttcaaatcat ataagggtgt 960
aaaaactgcc tactctgcaa tgacatcttc tgcattatTT ggtatggcat ggacatacga 1020
gcatttcgaa aagtctgaat ttgaaaagat ggatcgTTtg tTTtggtgtg gtggtaaata 1080
ctctgactat cctccccac ctcttaaaaa ccagatgac gaaaaagaag tagaaagcga 1140
tgatagtga gatgagctca tgtacggaca caagaaaggt attgctgaca cggtagaatc 1200
tattcttgta ccaggaacag attggTTTgt taccaatTTT gatagggggT ttggaaatag 1260
gttttattat agaggaaaga gattactttc tcagccttgg tcccatttat cgcatacga 1320
tattctcccc aataaaagct atcgaaatcc agagatttat ccactgatc aaacattaa 1380
aatcactagt tctctcgatt gcgatcatgg agctTTTctt ggtggaacct cgcttattat 1440
caaaggccaa cgTTtcaatc atagagaatc gcatgatgtt gaaactgaaa ttagtatacc 1500
tctgtataag cTTtcaatag atgctagtaa aggatgctca ttgcgttata tttatagaac 1560
tttgttgatg aaagatgtaa agttgacagt agcatgtcac ttttcgttaa aaacaaacga 1620
ctcagTTaat ttcttcaagg tatggcagcc agatgaaaat ttctctTTtg aatatgatga 1680
tggaatgaga gccactgtta caactgaaaa ttctaccgaa agcagatgct ttttattacg 1740
tacaacagaa gaagatacag gagaaaatga ttggataaca aaaactatta atgtgcctgc 1800
tgttccagaa ggaagtcaat tatacattac aagacttgaa gtgagcgtag tattagatac 1860
agctggTTta gtaggtcttg ttaatcaagt tattgcttgc ttgggatata ttagcatcat 1920


```

accaactata aattctggaa taaaaacaga ttcattcacgc attattcagg atctcttttg 1980
gaaagatcag aaatatacca aaatcggaag agaaagttaa gacgacatag ctcaagaaga 2040
agttcataga tattatggaa cattgaactg ggaaaacaca gcaaattgtag taaacgcttg 2100
ggaggaaata gattactaca acgtttttta caaagaaagt gacgactctg caactcgcat 2160
cttttttagga acagcattct gtaatcaatt tcgtgtatct ggtttagata ttattttatc 2220
taagctacca aagatagtta ttgaagctgt taacaaagaa ggatacatct cttcaagtgg 2280
tagcatagat ttgtcattaa actaggactt gaaataaaat attatgataa agaaaaaaaa 2340
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ggcggccgc 2369

```

<210> 2

<211> 2235

<212> DNA

<213> *Mucor hiemalis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2235)

<400> 2

```

atg cct tca ctt caa ttg caa cct gat gac aaa cta gca cct gtt tct 48
Met Pro Ser Leu Gln Leu Gln Pro Asp Asp Lys Leu Ala Pro Val Ser
  1           5           10           15
ttt gca ctt aag tct atg aat gag ttg agg gac tgg acg cca gac gaa 96
Phe Ala Leu Lys Ser Met Asn Glu Leu Arg Asp Trp Thr Pro Asp Glu
          20           25           30
aag ata aag ttt aac gtt tca agc gtg gca cta cag cct cgt gtg aaa 144
Lys Ile Lys Phe Asn Val Ser Ser Val Ala Leu Gln Pro Arg Val Lys
        35           40           45

```

aac gcc ctg aaa cct caa tta ttg tta act cat gat atg gca gga gga 192
 Asn Ala Leu Lys Pro Gln Leu Leu Leu Thr His Asp Met Ala Gly Gly
 50 55 60
 tat aaa gaa gat aaa aat att caa gga aac aat tat aaa gac att tat 240
 Tyr Lys Glu Asp Lys Asn Ile Gln Gly Asn Asn Tyr Lys Asp Ile Tyr
 65 70 75 80
 aac att caa tat tgg cat tta gct gat act ttt gta tat ttc tct cat 288
 Asn Ile Gln Tyr Trp His Leu Ala Asp Thr Phe Val Tyr Phe Ser His
 85 90 95
 gag cga gtt agc att cct cca gtc aat tgg aca aat gct tgt cat aga 336
 Glu Arg Val Ser Ile Pro Pro Val Asn Trp Thr Asn Ala Cys His Arg
 100 105 110
 aat ggt gta aag tgt tta ggt act ttt tta gta gaa gga aat aac caa 384
 Asn Gly Val Lys Cys Leu Gly Thr Phe Leu Val Glu Gly Asn Asn Gln
 115 120 125
 atg cat gaa atg gaa gcc ttg ctt cac ggt cca cct tta ctt aat aac 432
 Met His Glu Met Glu Ala Leu Leu His Gly Pro Pro Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 act gac gac cct atg aga tta tgg agt ccg tat tat gca gac caa tta 480
 Thr Asp Asp Pro Met Arg Leu Trp Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Gln Leu
 145 150 155 160
 gtt gct att gct aaa cac tat ggt ttt gat ggc tgg ttg ttc aat att 528
 Val Ala Ile Ala Lys His Tyr Gly Phe Asp Gly Trp Leu Phe Asn Ile
 165 170 175
 gaa tgc gaa ttc ttt cct ttt cct aca aat cca aaa ttc aaa gct gaa 576
 Glu Cys Glu Phe Phe Pro Phe Pro Thr Asn Pro Lys Phe Lys Ala Glu
 180 185 190
 gag ttg gca aag ttt cta cac tat ttt aag gaa aaa ttg cat aac gaa 624
 Glu Leu Ala Lys Phe Leu His Tyr Phe Lys Glu Lys Leu His Asn Glu

195	200	205	
ata cct gga tct caa ctc att tgg tac gac agc atg aca aat gaa gga			672
Ile Pro Gly Ser Gln Leu Ile Trp Tyr Asp Ser Met Thr Asn Glu Gly			
210	215	220	
gaa atc cac tgg cag aac cag ctc aca tgg aaa aat gag tta ttt ttt			720
Glu Ile His Trp Gln Asn Gln Leu Thr Trp Lys Asn Glu Leu Phe Phe			
225	230	235	240
aaa aac acg gat ggt att ttt ttg aat tat tgg tgg aaa aaa gaa tac			768
Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr Trp Trp Lys Lys Glu Tyr			
245	250	255	
cct gaa atg gcg cgt aga gta gct gaa gga ata ggt aga tca ggt tta			816
Pro Glu Met Ala Arg Arg Val Ala Glu Gly Ile Gly Arg Ser Gly Leu			
260	265	270	
gaa gtt tat ttt ggt aca gat gta tgg gga agg cat act tat ggt ggc			864
Glu Val Tyr Phe Gly Thr Asp Val Trp Gly Arg His Thr Tyr Gly Gly			
275	280	285	
ggg ggt ttc aaa tca tat aag ggt gta aaa act gcc tac tct gca atg			912
Gly Gly Phe Lys Ser Tyr Lys Gly Val Lys Thr Ala Tyr Ser Ala Met			
290	295	300	
aca tct tct gca tta ttt ggt atg gca tgg aca tac gag cat ttc gaa			960
Thr Ser Ser Ala Leu Phe Gly Met Ala Trp Thr Tyr Glu His Phe Glu			
305	310	315	320
aag tct gaa ttt gaa aag atg gat cgt ttg ttt tgg tgt ggt ggt aaa			1008
Lys Ser Glu Phe Glu Lys Met Asp Arg Leu Phe Trp Cys Gly Gly Lys			
325	330	335	
tac tct gac tat cct ccc cca cct cct aaa aac cca gat gac gaa aaa			1056
Tyr Ser Asp Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Lys Asn Pro Asp Asp Glu Lys			
340	345	350	
gaa gta gaa agc gat gat agt gaa gat gag ctc atg tac gga cac aag			1104

Glu Val Glu Ser Asp Asp Ser Glu Asp Glu Leu Met Tyr Gly His Lys
 355 360 365
 aaa ggt att gct gac acg gta gaa tct att cct gta cca gga aca gat 1152
 Lys Gly Ile Ala Asp Thr Val Glu Ser Ile Pro Val Pro Gly Thr Asp
 370 375 380
 tgg ttt gtt acc aat ttt gat agg ggg ttt gga aat agg ttt tat tat 1200
 Trp Phe Val Thr Asn Phe Asp Arg Gly Phe Gly Asn Arg Phe Tyr Tyr
 385 390 395 400
 aga gga aag aga tta ctt tct cag cct tgg tcc cat tta tcg cat caa 1248
 Arg Gly Lys Arg Leu Leu Ser Gln Pro Trp Ser His Leu Ser His Gln
 405 410 415
 gct att ctc ccc aat aaa agc tat cga aat cca gag att tat ccc act 1296
 Ala Ile Leu Pro Asn Lys Ser Tyr Arg Asn Pro Glu Ile Tyr Pro Thr
 420 425 430
 gat caa aac att aaa atc act agt tct ctc gat tgc gat cat gga gct 1344
 Asp Gln Asn Ile Lys Ile Thr Ser Ser Leu Asp Cys Asp His Gly Ala
 435 440 445
 ttt ctt ggt gga acc tcg ctt att atc aaa ggc caa cgt ttc aat cat 1392
 Phe Leu Gly Gly Thr Ser Leu Ile Ile Lys Gly Gln Arg Phe Asn His
 450 455 460
 aga gaa tcg cat gat gtt gaa act gaa att agt ata cct ctg tat aag 1440
 Arg Glu Ser His Asp Val Glu Thr Glu Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Lys
 465 470 475 480
 ctt tca tta gat gct agt aaa gga tgc tca ttg cgt tat att tat aga 1488
 Leu Ser Leu Asp Ala Ser Lys Gly Cys Ser Leu Arg Tyr Ile Tyr Arg
 485 490 495
 act ttg ttg atg aaa gat gta aag ttg aca gta gca tgt cac ttt tcg 1536
 Thr Leu Leu Met Lys Asp Val Lys Leu Thr Val Ala Cys His Phe Ser
 500 505 510

tta aaa aca aac gac tca gtt aat ttc ttc aag gta tgg cag cca gat 1584
 Leu Lys Thr Asn Asp Ser Val Asn Phe Phe Lys Val Trp Gln Pro Asp
 515 520 525
 gaa aat ttc tct ttt gaa tat gat gat gga atg aga gcc act gtt aca 1632
 Glu Asn Phe Ser Phe Glu Tyr Asp Asp Gly Met Arg Ala Thr Val Thr
 530 535 540
 act gaa aat tct acc gaa agc aga tgc ttt tta tta cgt aca aca gaa 1680
 Thr Glu Asn Ser Thr Glu Ser Arg Cys Phe Leu Leu Arg Thr Thr Glu
 545 550 555 560
 gaa gat aca gga gaa aat gat tgg ata aca aaa act att aat gtg cct 1728
 Glu Asp Thr Gly Glu Asn Asp Trp Ile Thr Lys Thr Ile Asn Val Pro
 565 570 575
 gct gtt cca gaa gga agt caa tta tac att aca aga ctt gaa gtg agc 1776
 Ala Val Pro Glu Gly Ser Gln Leu Tyr Ile Thr Arg Leu Glu Val Ser
 580 585 590
 gta gta tta gat aca gct ggt tta gta ggt ctt gtt aat caa gtt att 1824
 Val Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Val Asn Gln Val Ile
 595 600 605
 gct tgc ttg gga tat att agc atc ata cca act ata aat tct gga ata 1872
 Ala Cys Leu Gly Tyr Ile Ser Ile Ile Pro Thr Ile Asn Ser Gly Ile
 610 615 620
 aaa aca gat tca tca cgc att att cag gat ctc ttt tgg aaa gat cag 1920
 Lys Thr Asp Ser Ser Arg Ile Ile Gln Asp Leu Phe Trp Lys Asp Gln
 625 630 635 640
 aaa tat acc aaa atc gga aaa gaa agt tta gac gac ata gct caa gaa 1968
 Lys Tyr Thr Lys Ile Gly Lys Glu Ser Leu Asp Asp Ile Ala Gln Glu
 645 650 655
 gaa gtt cat aga tat tat gga aca ttg aac tgg gaa aac aca gca aat 2016
 Glu Val His Arg Tyr Tyr Gly Thr Leu Asn Trp Glu Asn Thr Ala Asn

660	665	670	
gta gta aac gct tgg gag gaa ata gat tac tac aac gtt ttt tac aaa			2064
Val Val Asn Ala Trp Glu Glu Ile Asp Tyr Tyr Asn Val Phe Tyr Lys			
675	680	685	
gaa agt gac gac tct gca act cgc atc ttt tta gga aca gca ttc tgt			2112
Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Arg Ile Phe Leu Gly Thr Ala Phe Cys			
690	695	700	
aat caa ttt cgt gta tct ggt tta gat att att tta tct aag cta cca			2160
Asn Gln Phe Arg Val Ser Gly Leu Asp Ile Ile Leu Ser Lys Leu Pro			
705	710	715	720
aag ata gtt att gaa gct gtt aac aaa gaa gga tac atc tct tca agt			2208
Lys Ile Val Ile Glu Ala Val Asn Lys Glu Gly Tyr Ile Ser Ser Ser			
725	730	735	
ggt agc ata gat ttg tca tta aac tag			2235
Gly Ser Ile Asp Leu Ser Leu Asn			
740	745		

<210> 3

<211> 744

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 3

Met Pro Ser Leu Gln Leu Gln Pro Asp Asp Lys Leu Ala Pro Val Ser

1

5

10

15

Phe Ala Leu Lys Ser Met Asn Glu Leu Arg Asp Trp Thr Pro Asp Glu

20

25

30

Lys Ile Lys Phe Asn Val Ser Ser Val Ala Leu Gln Pro Arg Val Lys

35	40	45
Asn Ala Leu Lys Pro Gln Leu Leu Leu Thr His Asp Met Ala Gly Gly		
50	55	60
Tyr Lys Glu Asp Lys Asn Ile Gln Gly Asn Asn Tyr Lys Asp Ile Tyr		
65	70	75
Asn Ile Gln Tyr Trp His Leu Ala Asp Thr Phe Val Tyr Phe Ser His		
85	90	95
Glu Arg Val Ser Ile Pro Pro Val Asn Trp Thr Asn Ala Cys His Arg		
100	105	110
Asn Gly Val Lys Cys Leu Gly Thr Phe Leu Val Glu Gly Asn Asn Gln		
115	120	125
Met His Glu Met Glu Ala Leu Leu His Gly Pro Pro Leu Leu Asn Asn		
130	135	140
Thr Asp Asp Pro Met Arg Leu Trp Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Gln Leu		
145	150	155
Val Ala Ile Ala Lys His Tyr Gly Phe Asp Gly Trp Leu Phe Asn Ile		
165	170	175
Glu Cys Glu Phe Phe Pro Phe Pro Thr Asn Pro Lys Phe Lys Ala Glu		
180	185	190
Glu Leu Ala Lys Phe Leu His Tyr Phe Lys Glu Lys Leu His Asn Glu		
195	200	205
Ile Pro Gly Ser Gln Leu Ile Trp Tyr Asp Ser Met Thr Asn Glu Gly		
210	215	220
Glu Ile His Trp Gln Asn Gln Leu Thr Trp Lys Asn Glu Leu Phe Phe		
225	230	235
Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr Trp Trp Lys Lys Glu Tyr		
245	250	255
Pro Glu Met Ala Arg Arg Val Ala Glu Gly Ile Gly Arg Ser Gly Leu		
260	265	270

Glu Val Tyr Phe Gly Thr Asp Val Trp Gly Arg His Thr Tyr Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Phe Lys Ser Tyr Lys Gly Val Lys Thr Ala Tyr Ser Ala Met
 290 295 300
 Thr Ser Ser Ala Leu Phe Gly Met Ala Trp Thr Tyr Glu His Phe Glu
 305 310 315 320
 Lys Ser Glu Phe Glu Lys Met Asp Arg Leu Phe Trp Cys Gly Gly Lys
 325 330 335
 Tyr Ser Asp Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Lys Asn Pro Asp Asp Glu Lys
 340 345 350
 Glu Val Glu Ser Asp Asp Ser Glu Asp Glu Leu Met Tyr Gly His Lys
 355 360 365
 Lys Gly Ile Ala Asp Thr Val Glu Ser Ile Pro Val Pro Gly Thr Asp
 370 375 380
 Trp Phe Val Thr Asn Phe Asp Arg Gly Phe Gly Asn Arg Phe Tyr Tyr
 385 390 395 400
 Arg Gly Lys Arg Leu Leu Ser Gln Pro Trp Ser His Leu Ser His Gln
 405 410 415
 Ala Ile Leu Pro Asn Lys Ser Tyr Arg Asn Pro Glu Ile Tyr Pro Thr
 420 425 430
 Asp Gln Asn Ile Lys Ile Thr Ser Ser Leu Asp Cys Asp His Gly Ala
 435 440 445
 Phe Leu Gly Gly Thr Ser Leu Ile Ile Lys Gly Gln Arg Phe Asn His
 450 455 460
 Arg Glu Ser His Asp Val Glu Thr Glu Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Lys
 465 470 475 480
 Leu Ser Leu Asp Ala Ser Lys Gly Cys Ser Leu Arg Tyr Ile Tyr Arg
 485 490 495
 Thr Leu Leu Met Lys Asp Val Lys Leu Thr Val Ala Cys His Phe Ser

500	505	510
Leu Lys Thr Asn Asp Ser Val	Asn Phe Phe Lys Val Trp	Gln Pro Asp
515	520	525
Glu Asn Phe Ser Phe Glu Tyr Asp	Asp Gly Met Arg Ala Thr	Val Thr
530	535	540
Thr Glu Asn Ser Thr Glu Ser Arg	Cys Phe Leu Leu Arg Thr	Thr Glu
545	550	555
Glu Asp Thr Gly Glu Asn Asp Trp	Ile Thr Lys Thr Ile Asn	Val Pro
565	570	575
Ala Val Pro Glu Gly Ser Gln Leu	Tyr Ile Thr Arg Leu Glu	Val Ser
580	585	590
Val Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu	Val Gly Leu Val Asn Gln	Val Ile
595	600	605
Ala Cys Leu Gly Tyr Ile Ser Ile	Ile Pro Thr Ile Asn Ser	Gly Ile
610	615	620
Lys Thr Asp Ser Ser Arg Ile Ile	Gln Asp Leu Phe Trp Lys	Asp Gln
625	630	635
Lys Tyr Thr Lys Ile Gly Lys Glu	Ser Leu Asp Asp Ile Ala Gln	Glu
645	650	655
Glu Val His Arg Tyr Tyr Gly Thr	Leu Asn Trp Glu Asn Thr	Ala Asn
660	665	670
Val Val Asn Ala Trp Glu Glu Ile	Asp Tyr Tyr Asn Val Phe	Tyr Lys
675	680	685
Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Arg	Ile Phe Leu Gly Thr Ala	Phe Cys
690	695	700
Asn Gln Phe Arg Val Ser Gly Leu	Asp Ile Ile Leu Ser Lys	Leu Pro
705	710	715
Lys Ile Val Ile Glu Ala Val Asn	Lys Glu Gly Tyr Ile Ser	Ser Ser
725	730	735

Gly Ser Ile Asp Leu Ser Leu Asn

740

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial amino acid sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase

<400> 4

Pro Ser Leu Gln Leu Gln Pro Asp Asp Lys

1

5

10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the partial amino acid
sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase

<220>

<221> modified_base

<222> 12

<223> n represents a, g, c or t

<400> 5

carttrcarc cngaygayaa

20

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial amino acid sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase

<400> 6

Ser Tyr Arg Asn Pro Glu Ile Tyr Pro Thr Asp Gln Asn Ile Lys

1

5

10

15

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the partial amino acid
sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase

<220>

<221> modified_base

<222> 6

<223> n represents a, g, c or t

<400> 7

cchacngayc araayatya

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the partial amino acid
sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase

<220>

<221> modified_base

<222> 15

<223> n represents a, g, c or t

<400> 8

ttratrtrtyt grtcngtdgg

20

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial amino acid sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase

<400> 9

Gly Gln Arg Phe Asn His Arg Glu Ser His Asp Val Glu Thr Glu Ile

1

5

10

15

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the partial amino acid
sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase

<400> 10

tgrtttraadc gytgdccytt

20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide sequence of 5' terminal region of
endo- β -N-acetylglucosaminidase gene

<400> 11

atgccttcac ttcaattgca acc

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide sequence of 3' terminal region of
endo- β -N-acetylglucosaminidase gene

<400> 12

ctagtttaat gacaaatcta tgc

23

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the sequence of
endo- β -N-acetylglucosaminidase gene

<400> 13

cacttaagtc tatgaatgag

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the sequence of
endo- β -N-acetylglucosaminidase gene

<400> 14

aatctctgga ttctgatagc

20

<210> 15

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the sequence of
endo- β -N-acetylglucosaminidase gene

<400> 15

ggggcggccg cttttatattt acataaatat gccttcactt c

41

<210> 16

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide designed based on the sequence of
endo- β -N-acetylglucosaminidase gene

<400> 16

cccgcggccg cctagtttaa tgacaaatct atgctacc

38

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 17

Pro Ser Leu Gln Leu Gln Pro Asp Asp Lys

1

5

10

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 18

Lys Ser Tyr Arg Asn Pro Glu Ile Tyr Pro Thr Asp Gln Asn Ile Lys

1 5 10 15

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 19

Lys Phe Asn Val Ser Ser Val Ala Leu Gln Pro Arg Val Lys

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 2

<223> Xaa represents Met or Ser

<400> 20

Lys Xaa Asp Arg Leu Phe Leu Cys Gly Gly Lys

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mucor hiemalis*

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 2

<223> Xaa represents Gly or Met

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 3

<223> Xaa represents Gln or Ala

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 4

<223> Xaa represents Arg or Leu

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 6

<223> Xaa represents Asn or Pro

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 8

<223> Xaa represents Arg or Leu

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 9

<223> Xaa represents Glu or Leu

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 10

<223> Xaa represents Ser or Leu

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 11

<223> Xaa represents His or Thr

<400> 21

Lys Xaa Xaa Xaa Phe Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Val Glu Thr Glu

1

5

10

15

Ile

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 22

Lys Glu Gly Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ile Asp Leu Ser Leu Asn

1 5 10 15

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 23

Lys Asn Ile Gln Gly Asn Asn Tyr Lys

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 24

Lys Tyr Ser Asp Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Lys

1 5 10

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 25

Lys Leu Ser Leu Asp Ala Ser Lys

1

5

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 26

Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr Trp Trp Lys

1

5

10

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 3

<223> Carboxymethylcystein

<400> 27

Lys Gly Cys Ser Leu Arg Tyr Ile Tyr Arg Thr Leu Leu Met Lys

1

5

10

15

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 6

<223> Carboxymethylcystein

<400> 28

Lys Leu Thr Val Ala Cys His

1

5

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 29

Lys Pro Gln Leu Leu Leu Thr His Asp Met Ala Gly Gly Tyr Lys

1

5

10

15

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 30

Lys Ser Met Asn Glu Leu Arg Asp Trp Thr Pro Asp Glu Lys

1

5

10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 31

Lys Leu Ala Pro Val Ser Phe Ala Leu Lys

1

5

10

<210> 32

<211> 23

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 32

Lys Gly Gln Arg Phe Asn His Arg Glu Ser His Asp Val Glu Thr Glu

1

5

10

15

Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Lys

20

<210> 33

<211> 22

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 8

<223> Carboxymethylcystein

<400> 33

Lys Ile Thr Ser Ser Leu Asp Cys Asp His Gly Ala Phe Leu Gly Gly

1

5

10

15

Thr Ser Leu Ile Ile Lys

20

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 34

Lys Asn Glu Leu Phe Phe Lys Asn Thr Asp Gly Ile Phe Leu Asn Tyr

1

5

10

15

Trp Trp Lys

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 35

Lys Ile Val Ile Glu Ala Val Asn Lys

1

5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 36

Ser Ser Arg Ile Ile Gln Asp Leu Phe Trp Lys

1

5

10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Mucor hiemalis

<400> 37

Lys Thr Asp Ser Ser Arg Ile Ile Gln Asp Leu Phe Trp Lys

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/02644

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N9/14, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/19 // (C12N15/55, C12R1:785) (C12N9/14, C12R1:865) (C12N1/19, C12R1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N9/14, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Agric. Biol. Chem. 54 [1] (1990) Kadowaki S et al., "Purification and Characterization of a Novel Fungal Endo- β -N-acetylglucosaminidase Acting on Complex Oligosaccharides of Glycoproteins" p.97-106	1-9
Y	Sambrook J., Fritsch F.E., Maniatis T. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)" (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search
17 August, 1999 (17. 08. 99)

Date of mailing of the international search report
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N9/14, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/19 //(C12N15/55, C12R1:785) (C12N9/14, C12R1:865)
(C12N1/19, C12R1:865)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N9/14, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Agric. Biol. Chem. 54 [1] (1990) Kadowaki S et al. "Purification and Characterization of a Novel Fungal Endo- β -N-acetylglucosaminidase Acting on Complex Oligosaccharides of Glycoproteins" p.97-106	1-9
Y	Sambrook J., Fritsch F.E., Maniatis T. et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)" (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.08.99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448


PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-657-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02644	国際出願日 (日.月.年) 20.05.99	優先日 (日.月.年) 22.05.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N 9/14, C12N 15/55, C12N 15/63, C12N 1/19 // (C12N 15/55, C12R 1:785) (C12N 9/14, C12R 1:865) (C12N 1/19, C12R 1:865)		
出願人 (氏名又は名称) 麒麟麦酒株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。	
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。	
<input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。	
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。	
I	<input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎
II	<input type="checkbox"/> 優先権
III	<input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV	<input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如
V	<input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI	<input type="checkbox"/> ある種の引用文献
VII	<input type="checkbox"/> 国際出願の不備
VIII	<input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06.10.99	国際予備審査報告を作成した日 27.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B 9358
	小暮 道明 印 	電話番号 03-3581-1101 内線 3448

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
進歩性 (I S)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1 - 9 に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。

67

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-657-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/02644	International filing date (day/month/year) 20 May 1999 (20.05.99)	Priority date (day/month/year) 22 May 1998 (22.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/14, 15/55, 15/63, 1/19 // (C12N 15/55, C12R 1:785)(C12N 9/14, 1:865)(C12N 1/19, C12R 1:865)		
Applicant KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 06 October 1999 (06.10.99)	Date of completion of this report 27 April 2000 (27.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02644

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02644

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The inventions disclosed in claims 1-9 are neither disclosed in either of the documents cited in the ISR or any other documents considered to bear relation to said inventions, nor is it considered that they could have easily been invented by a person skilled in the art by combining the disclosures in said documents.